

令和 2 年度 博士学位論文

c-Met を標的とした
新規抗体-薬物複合体の創薬研究

藤田 領

目次

緒言	1
第 1 章 新規抗 c-Met 抗体の作製	6
1-1 抗 c-Met マウスモノクローナル抗体の作製と P3D12 抗体の同定	6
1-2 抗 c-Met 抗体による c-Met シグナル依存性細胞増殖の確認	9
1-3 抗 c-Met 抗体の親和性と種交差性の決定	11
1-4 小括	13
第 2 章 新規抗 c-Met 抗体を用いた 抗体・薬物複合体（Antibody・Drug Conjugate : ADC）の作製とその効果	14
2-1 <i>in vitro</i> における c-Met 遺伝子の増幅および非増幅がん細胞株に対する抗 c-Met ADC の効果	14
2-2 <i>in vivo</i> における抗 c-Met ADC の薬物動態と抗腫瘍効果	24
2-3 小括	30
第 3 章 抗 c-Met マウスモノクローナル抗体のヒト化	31
3-1 ドメインサブクラス変換による抗 c-Met マウスモノクローナル抗体 P3D12 の改良	31
3-2 抗 c-Met マウスモノクローナル抗体 P3D12 のヒト化および結合活性の評価	34
3-3 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> におけるヒト化抗体 hD12 の特性評価	37
3-4 小括	42

第 4 章 抗体・薬物複合体（ADC）製剤の安定性向上への検討	43
4-1 hD12 抗体に適したリンカー・薬物の選択	43
4-2 抗体とリンカー・薬物の特異的な結合部位の決定	49
4-3 小括	50
考察（総括と展望）	58
材料と方法	65
引用文献	74
謝辞	86

略語一覽

ABC: antibody binding capacity

ADC: antibody–drug conjugate

CDR: complementarity determining region

CHO: Chinese Hamster Ovary

c-Met: c-mesenchymal epithelial transition factor

CTG: CellTiter-Glo

DAR: drug–antibody ratio

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

EGFR: epidermal growth factor receptor

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

FACS: fluorescence-activated cell sorting

FBS: Fetal Bovine Serum

HAMA: human anti-mouse antibody

HGF: hepatocyte growth factor

HRP: Horseradish peroxidase

kD: kilo Dalton

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MMAE: monomethyl auristatin E

MMAF: monomethyl auristatin F

NSCLC: non-small cell lung cancer

PBD: pyrrolobenzodiazepine

PBS: Phosphate-buffered saline

PE: Phycoerythrin

PK: pharmacokinetics

SEC: size-exclusion chromatography

SPR: Surface Plasmon Resonance

TFF: tangential flow filtration

TGI: tumor growth inhibition

TKI: Tyrosine Kinase Inhibitor

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

va: valine-alanine

vc: valine-citrulline

VEGF: vascular endothelial growth factor

緒言

がんは全世界における死因の第2位に位置し、先進国、後進国を問わず経済的な影響を与えている。多くのがんでは、単一のがん遺伝子の継続的な発現および遺伝子増幅が悪性化に関与していることが知られており、その遺伝子産物が低分子医薬や生物学的製剤の標的となりうる。c-Met(the receptor for hepatocyte growth factor (HGF))はチロシンキナーゼ型の受容体であり、胃がんでは75-90%、肺がんでは41-72%が高発現もしくは活性化されていると報告されており[1]、その恒常的な活性はがんの増殖に関係している[2]。2015年のアメリカ合衆国の統計では、全がん死のうちおよそ30%を肺がんが占めており、胃がんは1.8%程ではあるが、南アメリカ大陸、東ヨーロッパ、アジアでは増加の一途を辿っている[3]。また、c-Metタンパクの発現は、多くのがんの予後不良とも関連している[4, 5]。今日まで、いくつかのチロシンキナーゼ阻害薬 (Tyrosine Kinase Inhibitor : TKI) が臨床で使用され、c-Met 遺伝子が増幅された小規模の患者群 (胃がんでは6%、肺がんでは1%) もしくは exon14 skipping 変異の患者群で効果を発揮している[6]。しかしながら、これらのがんは最終的に阻害剤に対する抵抗性を獲得し、長期の治療効果は期待できない[7, 8]。

新しい試みとして抗 c-Met 抗体もしくは抗 HGF 抗体による臨床試験が行われており、試験初期段階では有効な治療のように思われた。いくつかの抗 c-Met 抗体が創製されたが[9, 10]、リガンドである HGF のように受容体を2量体化するアゴニスト活性を持つものも存在した。Onartuzumab (Genentech, Inc.) のようにアゴニスト活性を持たず c-Met シグナルを活性化させない抗体も臨床試験に臨んだが、非小細胞肺がん (non-small-cell lung cancer : NSCLC) を適応とした臨

床第 3 相試験においても十分な効果を発揮していない[11]。

そこで本研究では c-Met シグナルを活性化することなく、かつ c-Met の遺伝子増幅の有無にかかわらず有効な c-Met を標的する抗体治療法を確立した。本研究で創製し P3D12 と命名した抗 c-Met マウスモノクローナル抗体は、ヒトだけでなくサル、ラットの c-Met にも親和性を持ち、c-Met シグナルの下流に位置し細胞の増殖に関係する ERK のリン酸化を最小限に抑え、かつ c-Met の分解を誘導した。さらに、この抗体と細胞障害性薬物を結合させ、抗体-薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate: ADC) を作製した。ADC とは、標的特異性の高い抗体と細胞障害活性の強い薬物を化学的リンカーを介して共有結合させた薬剤である (図 1)。ADC は抗体部分の選択的な結合によって標的を発現するがん細胞に結合した後に細胞内に取り込まれ、遊離された細胞障害性薬物によって選択的な抗がん作用を発揮する (図 2)。P3D12 に Valine-Citrulline (vc) と呼ばれるペプチドリinker で Monomethyl auristatin F (MMAF) を連結させた ADC である P3D12-vc-MMAF は *in vitro* での種々の胃がんおよび肺がん細胞株を用いた細胞毒性試験、およびマウスを用いた異種移植試験において、既存の c-Met チロシンキナーゼ阻害剤 (PHA-665752) よりも強い細胞毒性と腫瘍増殖抑制作用を示した。

次に、本研究で hD12 と命名したヒト化抗 c-Met 抗体について報告する。hD12 は P3D12 の complementarity determining region (CDR) をヒト IgG₂ に移植することで作製されたものであり、P3D12 の各種 (ヒト、サル、ラット) c-Met への親和性を失うことなく、かつ c-Met シグナルの活性化をさらに低減させた抗体である (図 3)。hD12 を DNA 架橋に基づく強い細胞毒性活性を有する合成 pyrrolobenzodiazepine (PBD) 2 量体と結合させた ADC は *in vitro/vivo* 両試験で効果を発揮した。その後、効果の維持、毒性の最小化のために hD12 に結合さ

せる最適なリンカー-薬物を選択した。さらに、抗体とリンカー-薬物の結合に関する均一性、および製剤の安定性を図った。通常、抗体にリンカー-薬物を結合させる際には、抗体のジスルフィド結合を一時的に開裂させる、もしくはリジン残基のアミノ基を利用し部位非特異的に結合を行う。本研究では、抗体に変異を導入し、その部位特異的にリンカー-薬物を結合させることで抗体とリンカー-薬物の均一な結合を達成した（図 3）。最後に、齧歯類を用いた毒性試験において、本薬剤に起因する有害事象は確認されなかった。

以上より、本研究では薬剤創製の過程において抗体の取得、ヒト化、リンカー-薬物の選択、部位特異的な結合を通して薬剤としての最適化を行った。取得したデータより、本薬剤は既存の薬剤より効果が強く **c-Met** 過剰発現腫瘍の治療のみならず、これまでの薬剤では効果が見込めなかった **c-Met** の発現が低い腫瘍でさえも治療の標的になりうることを示唆していた。このように、本剤は **c-Met** 陽性がんに対して新たな治療法を提供し、その効果を通してがんの治療改善に大きく貢献するものと期待される。

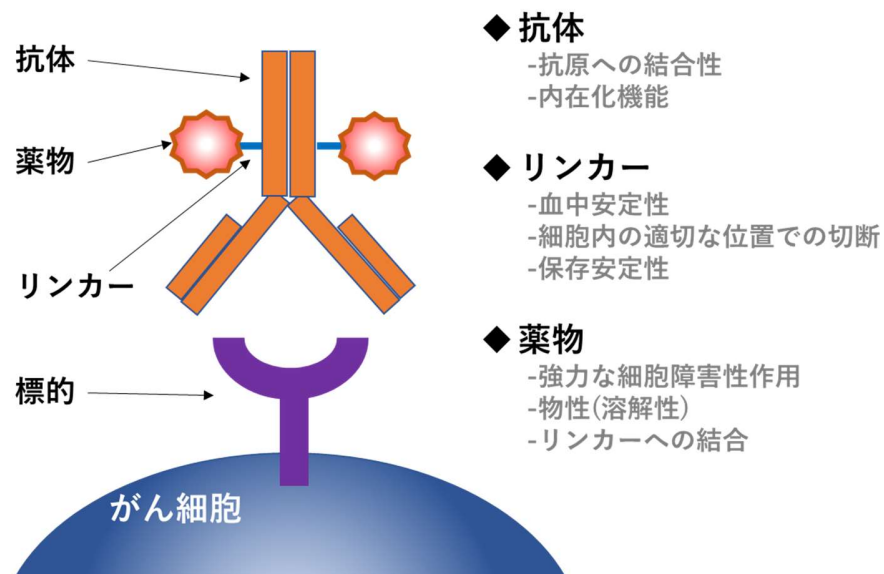


図 1 : Antibody-Drug Conjugate (ADC) の構成要素とその機能

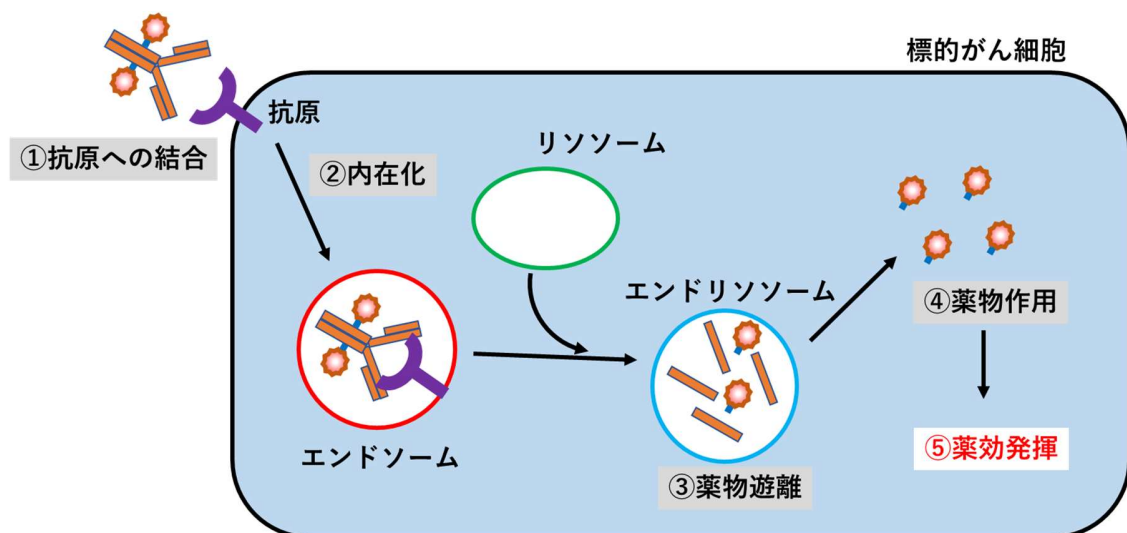


図 2 : Antibody-Drug Conjugate (ADC) の作用メカニズム

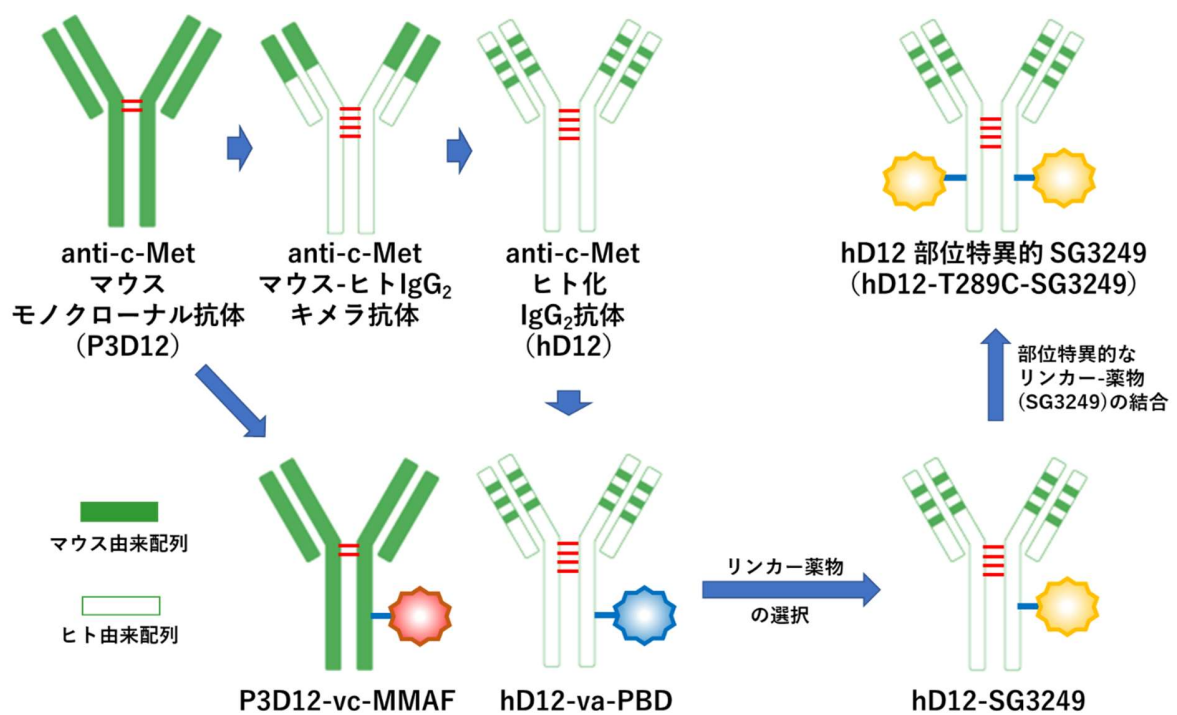


図 3：作製した抗体および ADC の変遷および略式図

第 1 章 新規抗 c-Met 抗体の作製

1-1 抗 c-Met マウスモノクローナル抗体の作製と P3D12 抗体の同定

これまでの多くの研究により、がん治療の目的で抗 c-Met 抗体の作製が試みられてきたが好ましい成果は得られていない[12]。5D5 (Genentech, Inc.) や DO-24 などの抗体が示すように[13]、多くの抗 c-Met 抗体は強力なアゴニスト作用を持ち、最終的にがん細胞の増殖を促進してしまう。そこで本研究では、以下に示す 3 つの選抜手順を経ることで c-Met に高い親和性を持ち、かつアゴニスト活性の低い抗体を取得した。

マウスに組み換えヒト c-Met タンパクの細胞外ドメインを免疫し、その脾臓より B 細胞を採取、SP2 細胞と融合させることでハイブリドーマを取得した。最初のステップでは約 20,000 種のハイブリドーマ上清を用いて c-Met に特異的に結合するサンプルを ELISA 法によって選抜、かつ FACS 解析により内在化するものを選択した。次のステップでは、選択した約 500 種の抗体が c-Met の分解を誘導するのか否かを確認した (データ未公表)。この試験では評価する c-Met 発現細胞に抗体を添加し、反応後に細胞内の c-Met タンパクを定量する。そのため、抗体が標的に結合したのちに受容体が再利用されるのではなく、抗体-受容体複合体がリソソームへ運搬され分解されることの確認となる。既存の 5D5 抗体および選抜された代表的な 4 つの抗体 (P1E2, P3D12, P27F9, P1H5) はそれぞれ異なる c-Met 分解活性を示したが、その中でも P3D12 がもっとも強い c-Met 分解活性を示した (図 4)。最後のステップでは、c-Met 分解活性を持つ抗体について ERK のリン酸化活性を測定した。この試験では、c-Met 活性化の下流シグナルである ERK のリン酸化を c-Met 自体の活性化と下流シグナルの活性化の指標として使用した (図 5)。その結果、3 つの抗 c-Met 抗体 (P1E2、 P3D12、 P1H5) のアゴ

ニスト活性は c-Met の生理的リガンドである HGF よりもきわめて低いことが確認された。また、その 3 つの抗体のアゴニスト活性は代表的な抗 c-Met 抗体である 5D5 抗体よりも小さかった。

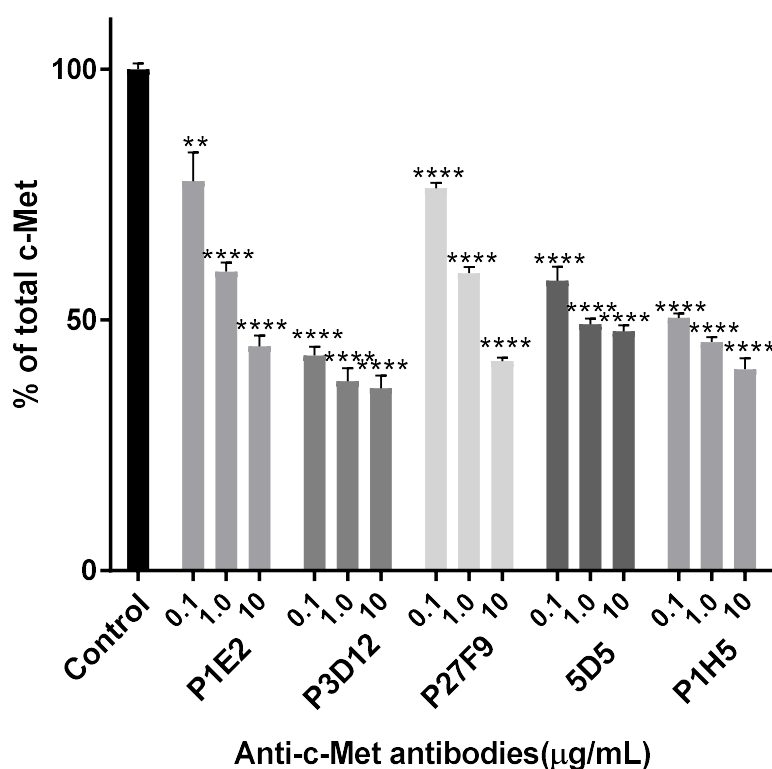


図 4 : 抗 c-Met 抗体の c-Met 内在化/分解の確認

SNU-16 細胞を用いた抗 c-Met 抗体による c-Met の分解は SECTOR Imager 2400 を用いて測定した。細胞に候補抗体を添加し、24 時間放置した。値は平均値±標準偏差 (n=3) % total c-Met で示し、統計的な解析は student t-test により算出した (* p < .05, ** p < .01, *** p < .001 and **** p < .0001 compared to control.) 。

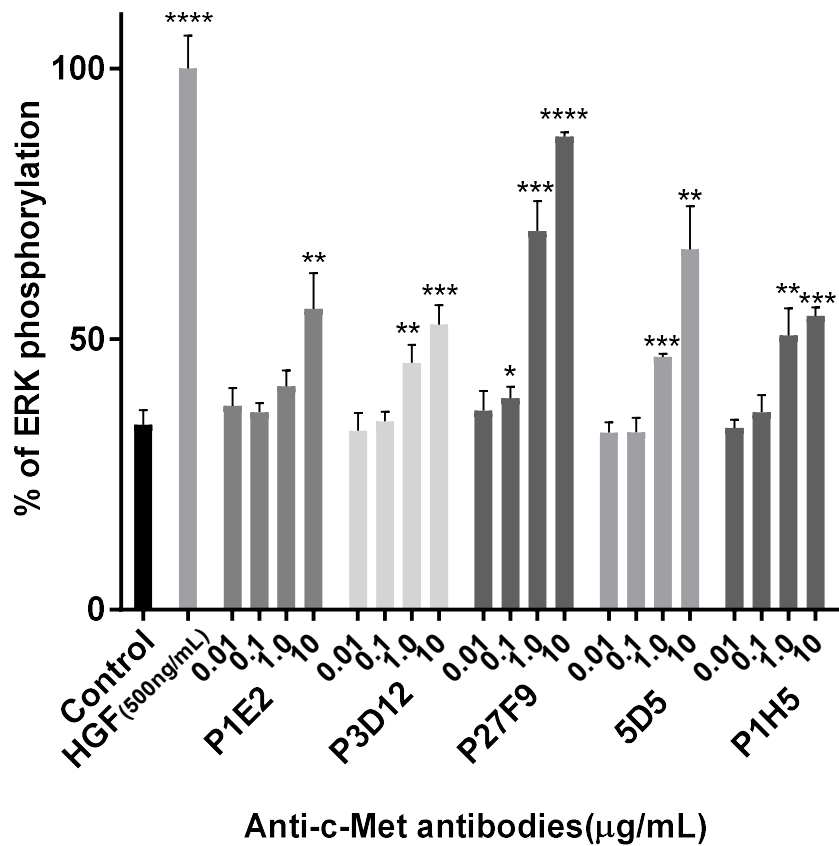


図 5：抗 c-Met 抗体のアゴニスト作用の確認（ERK のリン酸化）

MKN-45細胞を用いた抗c-Met抗体によるERKのリン酸化はSECTOR Imager 2400を用いて測定した。細胞に候補抗体を添加し、15分間放置した。値は平均値±標準偏差（n=3） % ERK phosphorylationで示し、統計的な解析はstudent t-testにより算出した（* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$ and **** $p < .0001$ compared to control.）。

1-2 抗 c-Met 抗体による c-Met シグナル依存性細胞増殖の確認

さらに詳細に各抗体の潜在的なアゴニスト活性を評価するため、HGF 依存的に細胞増殖を起こすサル上皮細胞である 4MBr-5 細胞に抗 c-Met 抗体を添加し、その細胞増殖を測定した（図 6）。その結果、HGF は濃度依存的に、また ERK のリン酸化活性の強い 5D5 抗体と今回の抗体候補の 1 つである P27F9 抗体も 4MBr-5 細胞の増殖を促進した。5D5 抗体は c-Met に対し強い親和性を持ち、かつ分解も促進するが、固有の c-Met アゴニスト活性により細胞の増殖を促進すると考えられる。一方、P3D12 抗体は 4MBr-5 細胞の増殖を促進しなかった。P3D12 は、わずかに c-Met アゴニスト活性（ERK のリン酸化活性）を有するが（図 5）、この活性は 4MBr-5 細胞の増殖に影響を与えなかった。以上より、P3D12 抗体は c-Met 下流シグナルの活性化を抑え、c-Met 受容体への結合とその後の内在化および分解を誘導すると考えられる。

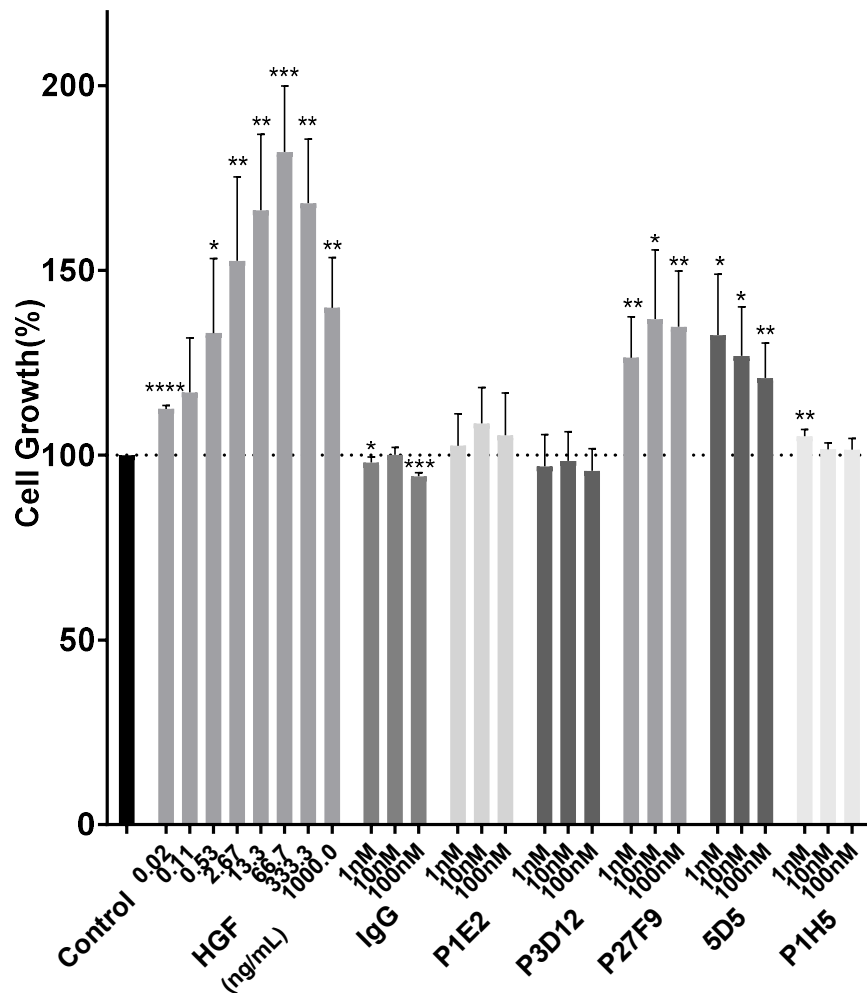


図 6：抗 c-Met 抗体による細胞増殖誘導作用の確認

4MBr-5細胞にHGF（陽性対照）、IgG（陰性対照）、5D5抗体、および4つの抗c-Met抗体（P1E2、P3D12、P27F9、P1H5）をそれぞれ添加、5日間放置し、CTGアッセイによりその増殖を測定した。値は3回の独立した試験（各n=2）から算出し、平均値±標準偏差（n=3）% Cell growthで示した。統計的な解析はstudent t-testにより算出した（* p < .05, ** p < .01, *** p < .001 and **** p < .0001 compared to control.）。

1-3 抗 c-Met 抗体の親和性と種交差性の決定

抗 c-Met 抗体の種交差性は各生物種の組み換え c-Met タンパクを用いて ELISA 法により確認した。試験に用いた抗 c-Met 抗体はすべてヒトとサルの c-Met に親和性を示し、その EC₅₀ はほとんど同様であり (1.2~1.4nM)、かつマウスとイヌの c-Met には反応しなかった (図 7)。興味深いことに、P3D12 抗体のみがラットの c-Met に親和性を示した (4.8nM)。表面プラズモン共鳴法による c-Met に対する親和性値は、P3D12 抗体 (0.75nM)、P1E2 抗体 (0.89nM) で、5D5 抗体 (0.80nM) と同等の親和性を示した (表 1)。それに対し、P1H5 抗体 (0.34nM) の親和性は 5D5 抗体よりも高く、P27F9 抗体 (1.31nM) は低かった。以上より、生物学的 (c-Met への結合および内在化/分解、低アゴニスト活性)、生物物理学的 (タンパクの安定性、ヒト c-Met への強力な親和性およびサル、ラット c-Met への種交差性) な性質より P3D12 抗体を最良の候補として決定した。

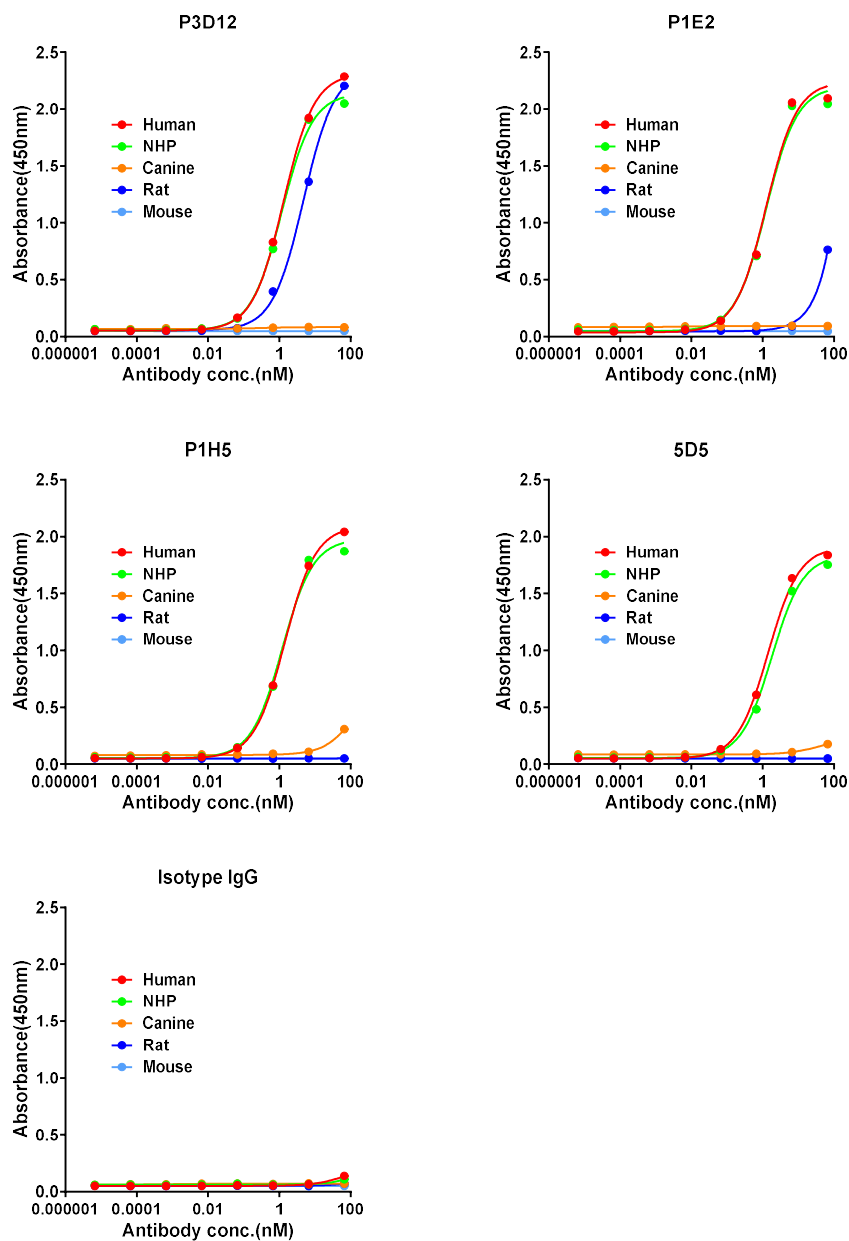


図7： 抗c-Met抗体の種類交差性

それぞれ希釈した抗c-Met抗体と陰性対照のIgGを各種（Human：ヒト、NHP：非ヒト霊長類、サル、Canine：イヌ、Rat：ラット、Mouse：マウス）c-Met組み換えタンパクと反応させ、ELISA法により評価した。

Antibody	$k_{on}(1/Ms)$	$k_{off}(1/s)$	$K_D(nM)$
P3D12	6.22E+05	4.93E-04	0.75
P1E2	5.83E+05	5.16E-04	0.89
P27F9	4.67E+04	6.11E-05	1.31
P1H5	3.80E+05	1.29E-04	0.34
5D5	2.21E+05	1.77E-04	0.80

表1： 抗c-Met抗体の速度論的結合定数

各抗体候補についてオン (k_{on}) およびオフ (k_{off}) 率と親和性測定値 (K_D) をまとめた。

1-4 小括

抗 c-Met 抗体は c-Met-TKI よりもすぐれた特異性（標的指向性）を持つが、治療を目的とした抗 c-Met 抗体の作製はその抗体が c-Met の下流シグナルを活性化しうること、また悪性の細胞増殖を引き起こし得ることから難しいと考えられてきた。そこで本研究では c-Met の分解を誘導し、低いアゴニスト活性しか持たず、かつヒトのみならずサル、ラットの c-Met にも交差性をもつ抗 c-Met マウスモノクローナル抗体を取得した。この抗体はラットの c-Met に交差性をもつが、リード抗体としての最適化の過程において、齧歯類を用いた標的依存性の毒性を評価できるという重要な特徴をもつ。次に本抗体を ADC 化することで効果の増強が図れないか検討を行った。

第 2 章 新規抗 c-Met 抗体を用いた 抗体-薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate : ADC) の作製とその効果

緒言で言及した通り、これまで多くの c-Met を標的とした TKI もしくは抗体が臨床の現場において使用されてきたが、最終的には薬剤に対する耐性を獲得し長期の効果が期待できない、もしくは目的の効果が得られないなどの問題を抱えている。そこで本研究では、今回作製した新規抗 c-Met 抗体に細胞障害性作用を持つ薬物を結合させることにより効果の増強が図れないか検討を行った。本試験で作製した抗体-薬物複合体に使用したリンカーは valine-citrulline (vc) と呼ばれるタイプのもので、標的細胞内において酵素によりリンカーの結合が解かれ、細胞障害性作用を持つ薬物が放出される。また、薬物には細胞膜透過性を持たない Monomethyl auristatin F (MMAF) を使用した。

2-1 *in vitro* における c-Met 遺伝子の増幅および非増幅がん細胞株に対する抗 c-Met ADC の効果

In vitro 細胞毒性試験における c-Met を標的とした TKI と c-Met-ADC の効果を比較するため、各細胞に試験試薬を加え 5 日間培養した後、CTG (Cell Titer Glo) 試薬を添加し、細胞の生存率 (有効性) と薬物の有効濃度 (効果) を測定した。今回使用した細胞株には c-Met 遺伝子の増幅による発現の上昇、もしくは非増幅ではあるが c-Met の発現が上昇しているものが含まれる (表 2)。遺伝子増幅とは 1 つの細胞中のゲノム上に本来のコピー数以上に遺伝子数が増加することであり、細胞周期のチェックポイント機能が壊れているなど多剤耐性の獲得に関与することなどが知られている。一方、非増幅の細胞群も何らかの理由で c-Met の

発現が増幅されており、遺伝子増幅・非増幅に関わらず効果を示すことができれば治療可能な患者層が広がることを意味する。

c-Met の高発現細胞株である MKN-45 細胞、SNU-620 細胞において、P3D12-vc-MMAF および P1E2-vc-MMAF は、c-Met 選択的キナーゼ阻害薬である PHA-665752 よりも高い効果を示した (図 8a-b、表 2)。同様の条件下で、非修飾の P3D12 抗体と P1E2 抗体は 50nM まで細胞毒性を示さなかった。PHA-665752 は、c-Met 遺伝子増幅を持たない細胞である SNU-16、H1975、H441、N87 に対して細胞死を誘導しなかったが、P3D12-vc-MMAF および P1E2-vc-MMAF は細胞毒性を発揮した (図 8c-f)。しかしながら、それぞれの有効性は H441 細胞、N87 細胞で約 50-60%、H1975 細胞では約 80%、SNU-16 細胞では約 90%程度であった (表 2)。

我々はさらに肺腺扁平上皮がん由来細胞の 1 つで c-Met 遺伝子の増幅を持たない H596 細胞 (図 8g)、および胃腺がん由来で c-Met 遺伝子の増幅を持つ Hs746T 細胞 (図 8h) でも評価した。両細胞の特徴として c-Met 遺伝子の第 14 エクソンを欠失していることが挙げられる。c-Met 遺伝子の第 14 エクソンは c-Met の内在化に関与する Cbl タンパクの結合部位を含んでおり、両細胞での評価は、我々が作製した ADC の内在化が Cbl の機能に依存するのかの 1 つの指標となる [14]。H596 細胞において、PHA-665752 は全く効果を表さなかった。一方、P3D12-vc-MMAF は明確な細胞毒性を示したものの、効果は他の c-Met 陽性細胞に対するものよりも低く、有効性も 30-40%程度に留まった (図 8g、表 2)。Hs746T 細胞においては、2 つの ADC、PHA-665752 と c-Met 高発現細胞に示した時と同程度の効果をそれぞれ発揮したが (IC₅₀ 値 P3D12-vc-MMAF : 13pM、P1E2-vc-MMAF : 72pM; PHA-665752 : 1.3nM)、有効性は 65-75%程度に留まった (図 8h、表 2)。実際に、H596 細胞、Hs746T 細胞では図 4 において SNU-16 細胞で

評価した結果と比較し、同濃度の P3D12 を添加したときの c-Met の内在化率(分解)は低く抑えられており(図 9)、ADC の内在化および細胞内の輸送が第 14 エクソンに変異を持たない細胞よりも滞っている可能性が示唆される。c-Met の発現がない SNU-1 細胞においては 2 つの ADC、PHA-665752 とともに全く効果、有効性とも示さなかった(図 8i)。これは両薬剤が安定性と c-Met に対して強い選択性を持つこと示している。

IC ₅₀ value for in vitro cytotoxicity(nM) and efficacy(%)				c-Met expression, Copy Number Variation(CNV), exon14 status		
				c-Met expression no. c-Met (x10 ³)/cell	MET CNV CCLE putative(Log2)	MET exon14 status
MKN-45	PHA-665752 3.6(94.7%)	P1E2-vcMMAF 0.28(97.6%)	P3D12-vcMMAF 0.12(97.6%)	-	700	-
SNU-620	4.4(100.0%)	0.10(84.6%)	0.06(87.7%)	-	850	-
H1975	-	0.29(76.7%)	0.03(76.2%)	5,000	0.61	-
SNU-16	-	1.19(91.3%)	0.26(88.8%)	-	0.69	-
H441	-	0.04(47.8%)	0.01(53.6%)	5,000	0.72	-
N87	-	0.26(59.1%)	0.03(57%)	1,700	0.13	-
Hs-746T	1.3(75.0%)	0.07(66.3%)	0.01(64.8%)	-	2.68	deletion
H596	-	26.3(35.7%)	0.13(37.5%)	400	-0.40	deletion
SNU-1	-	-	-	-	0.03	-

表2： 抗c-Met-ADC、c-Met-TKIのc-Met陽性がん細胞株に対する効果

c-Met-TKI (PHA-665752)、P1E2-vc-MMAF、P3D12-vc-MMAF、およびEGFR-TKI (Erlotinib) の効果を、8つのc-Met陽性細胞株と1つのc-Met陰性細胞株で評価した。細胞表面のc-Met受容体数、c-Metコピー数、およびexon14の状態は、9つのがん細胞株すべてについて表示した。値は3回の独立した細胞毒性試験の平均値で示している。c-Metコピー数多型データは、Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) から引用した。

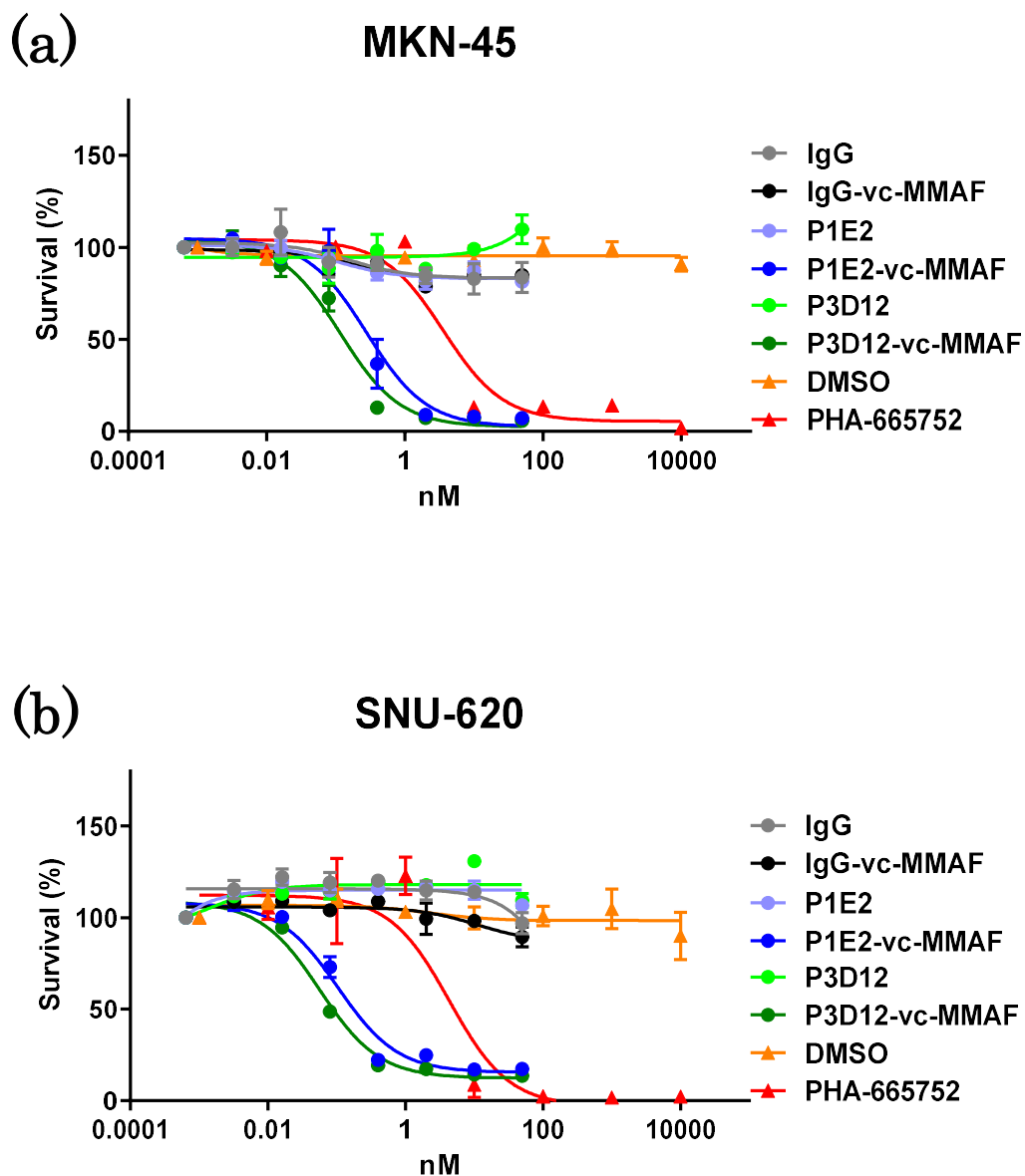


図8-1 : c-Met-ADCおよびc-Met選択的TKIの*in vitro*細胞毒性と特異性試験

各薬剤に対する感受性を6つのc-Met陽性がん細胞株、2つのc-Met変異がん細胞株、および1つのc-Met陰性がん細胞株で評価した。c-Met高発現細胞株 (a) MKN-45、(b) SNU-620、c-Met低中発現細胞株 (c) SNU-16、(d) H1975、(e) H441、(f) N87、c-Met変異細胞株 (g) H596、(h) Hs746 T、c-Met陰性細胞株 (i) SNU-1。

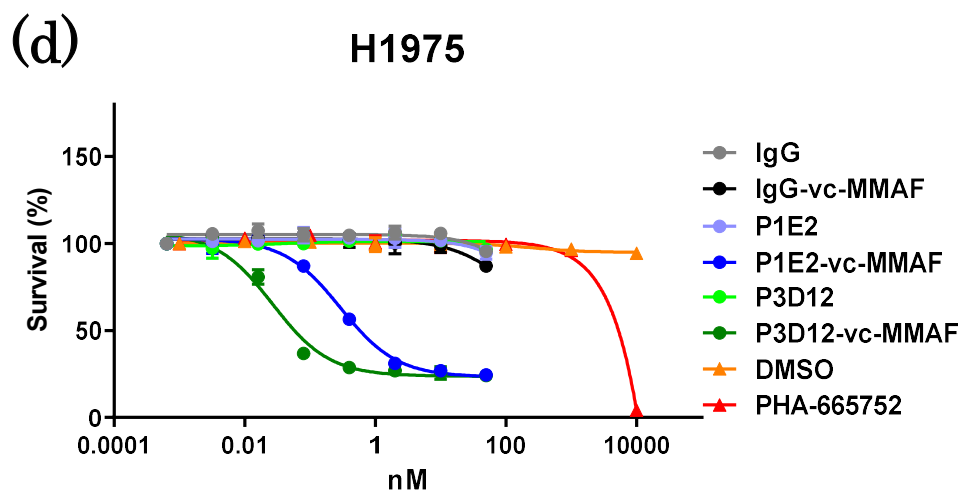
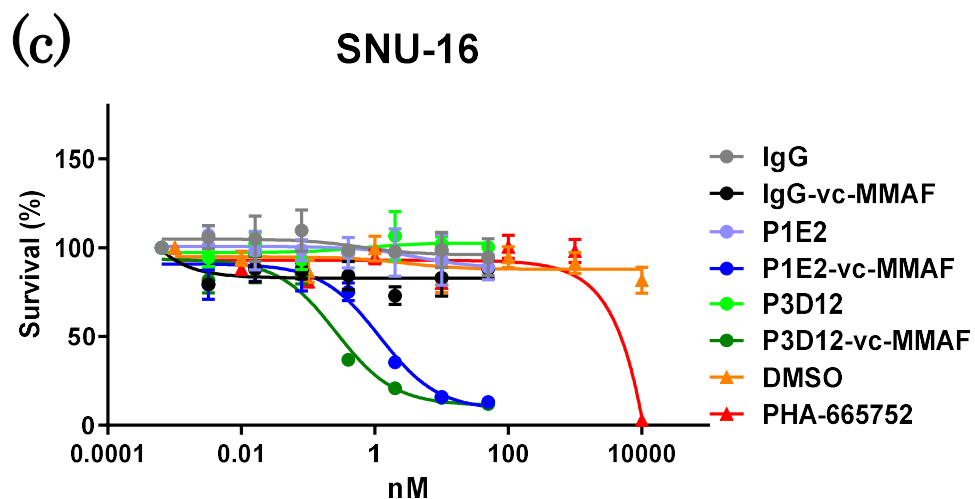


図8-2 : c-Met-ADCおよびc-Met選択的TKIの*in vitro*細胞毒性と特異性試験

各薬剤に対する感受性を6つのc-Met陽性がん細胞株、2つのc-Met変異がん細胞株、および1つのc-Met陰性がん細胞株で評価した。c-Met高発現細胞株 (a) MKN-45、(b) SNU-620、c-Met低中発現細胞株 (c) SNU-16、(d) H1975、(e) H441、(f) N87、c-Met変異細胞株 (g) H596、(h) Hs746 T、c-Met陰性細胞株 (i) SNU-1。

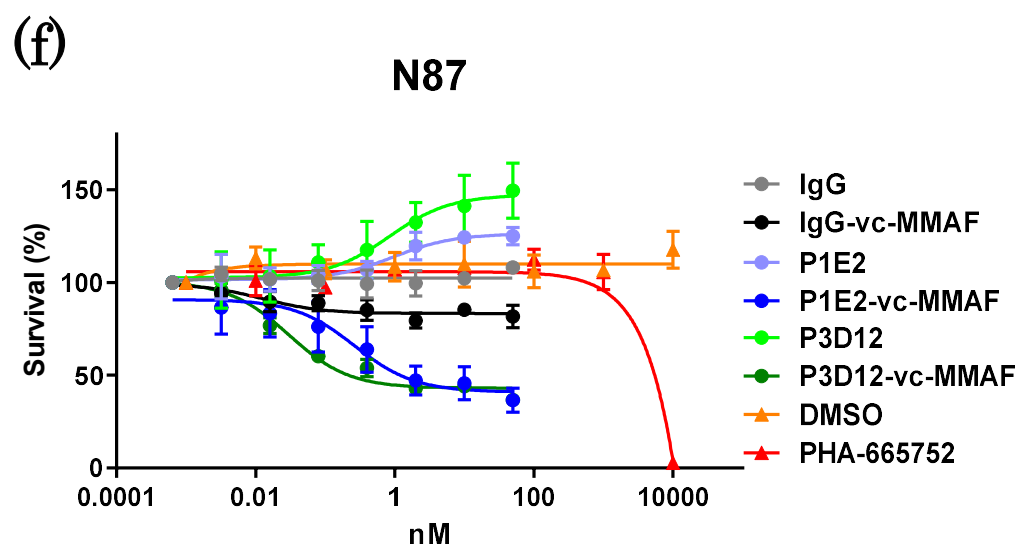
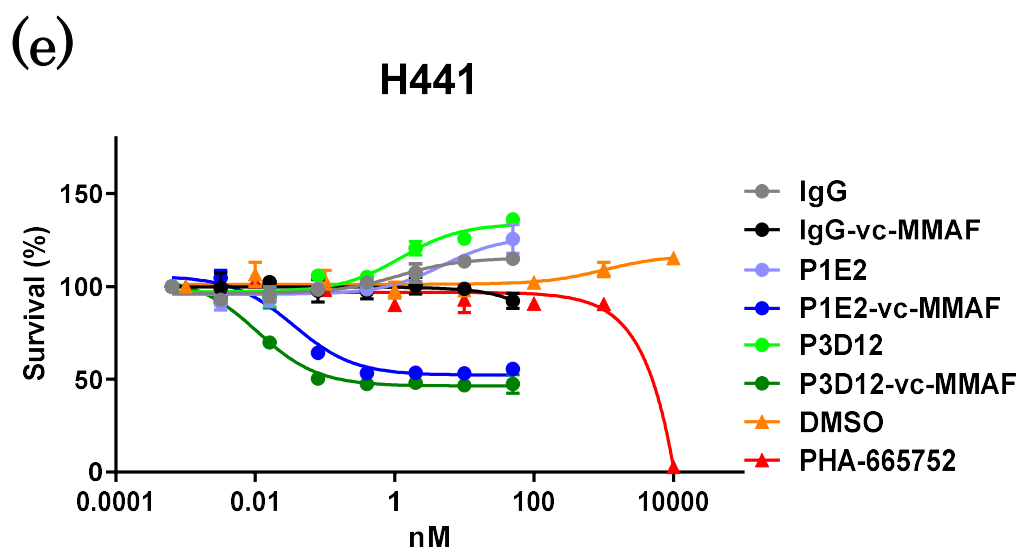


図8-3 : c-Met-ADCおよびc-Met選択的TKIの*in vitro*細胞毒性と特異性試験

各薬剤に対する感受性を6つのc-Met陽性がん細胞株、2つのc-Met変異がん細胞株、および1つのc-Met陰性がん細胞株で評価した。c-Met高発現細胞株 (a) MKN-45、(b) SNU-620、c-Met低中発現細胞株 (c) SNU-16、(d) H1975、(e) H441、(f) N87、c-Met変異細胞株 (g) H596、(h) Hs746 T、c-Met陰性細胞株 (i) SNU-1。

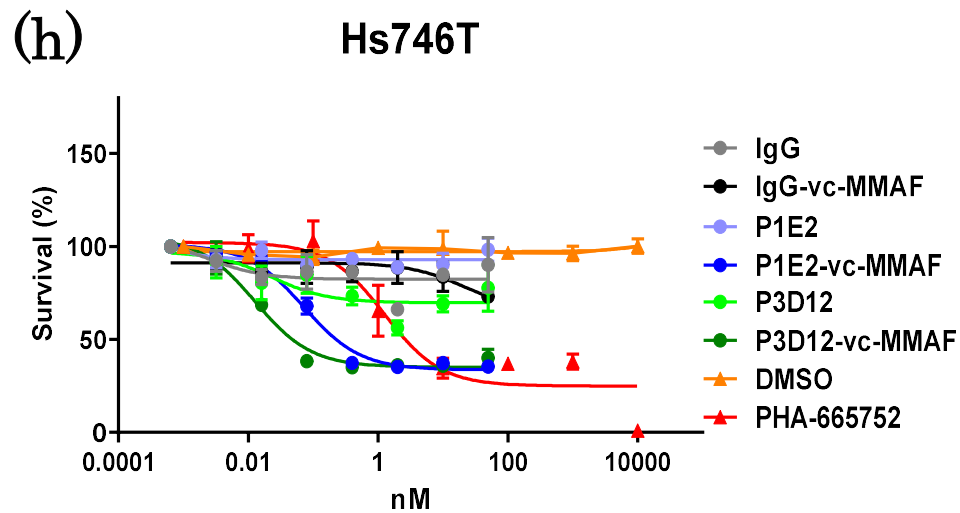
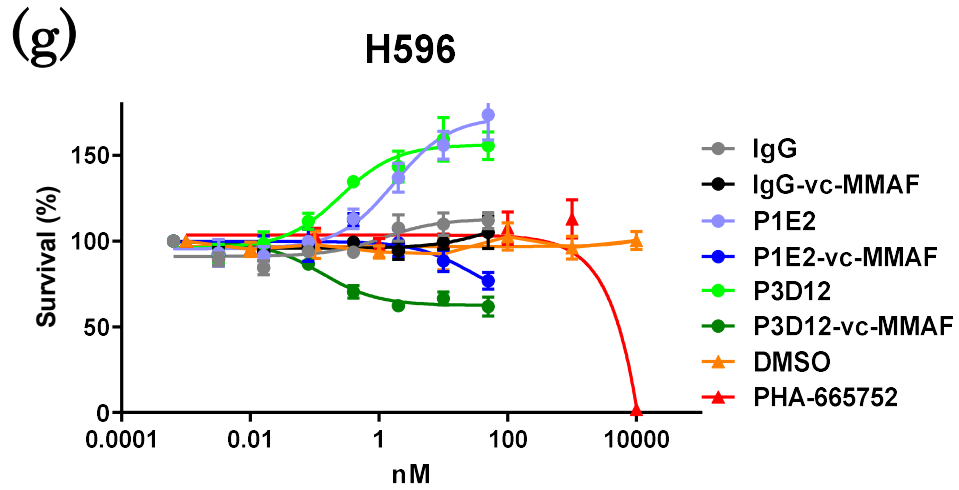


図8-4 : c-Met-ADCおよびc-Met選択的TKIの*in vitro*細胞毒性と特異性試験

各薬剤に対する感受性を6つのc-Met陽性がん細胞株、2つのc-Met変異がん細胞株、および1つのc-Met陰性がん細胞株で評価した。c-Met高発現細胞株 (a) MKN-45、(b) SNU-620、c-Met低中発現細胞株 (c) SNU-16、(d) H1975、(e) H441、(f) N87、c-Met変異細胞株 (g) H596、(h) Hs746 T、c-Met陰性細胞株 (i) SNU-1。

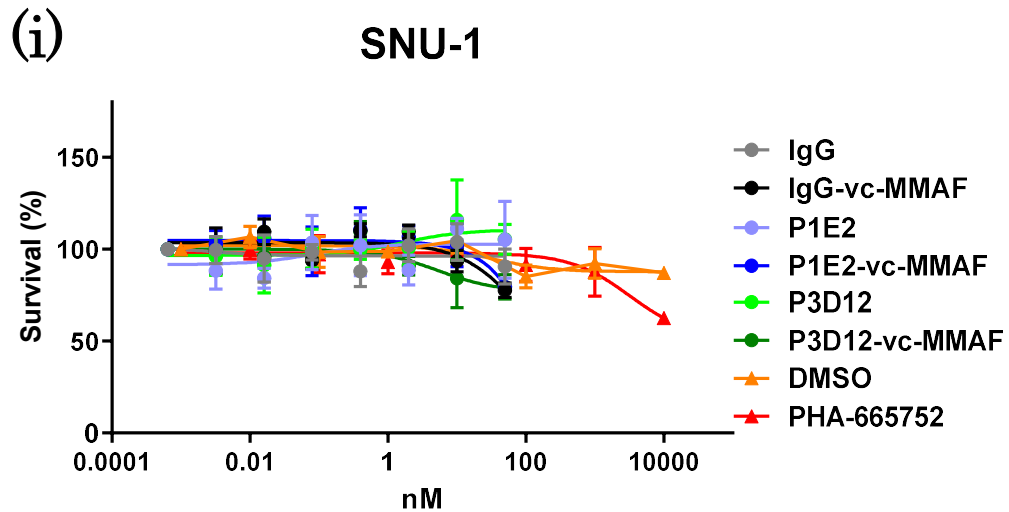


図8-5 : c-Met-ADCおよびc-Met選択的TKIの*in vitro*細胞毒性と特異性試験

各薬剤に対する感受性を6つのc-Met陽性がん細胞株、2つのc-Met変異がん細胞株、および1つのc-Met陰性がん細胞株で評価した。c-Met高発現細胞株 (a) MKN-45、(b) SNU-620、c-Met低中発現細胞株 (c) SNU-16、(d) H1975、(e) H441、(f) N87、c-Met変異細胞株 (g) H596、(h) Hs746 T、c-Met陰性細胞株 (i) SNU-1。

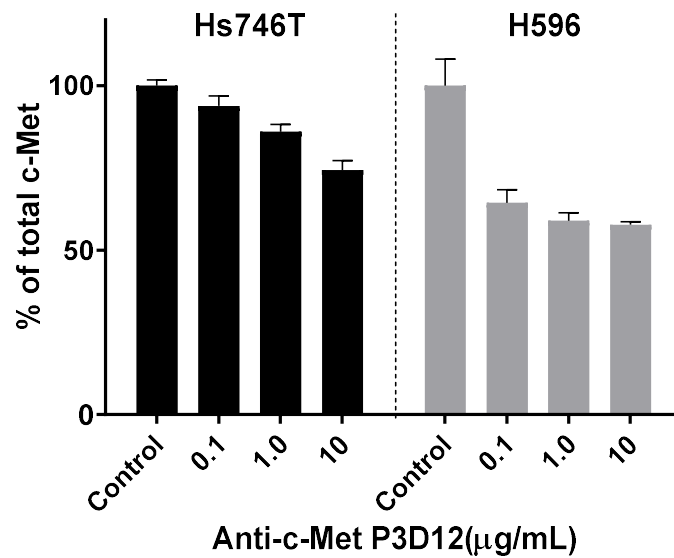


図9： c-Met変異細胞株に対するP3D12抗体のc-Met内在化/分解の確認

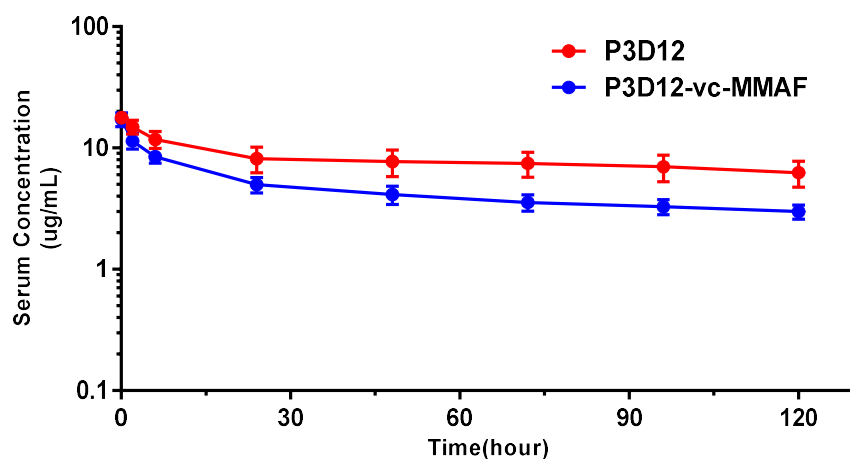
Hs746T細胞およびH596細胞を用いたP3D12抗体によるc-Metの分解はSECTOR Imager 2400を用いて測定した。細胞にP3D12抗体を添加し、24時間放置した。値は平均値±標準偏差（n=3）% total c-Metで示した。

2-2 *in vivo*における抗 c-Met ADC の薬物動態と抗腫瘍効果

血清中での P3D12 抗体と P3D12-vc-MMAF の安定性をマウス薬物動態試験により確認した (図 10)。各薬剤を 1mg/kg の濃度でマウス尾静脈より単回投与し、経時的に血液を採取、血清中に存在する薬剤の濃度を ELISA 法により測定した。図中の表はノンコンパートメント解析より算出した薬物動態指標を示している。P3D12 抗体と P3D12-vc-MMAF のマウス血清中の半減期はそれぞれ 7.84 日と 7.87 日であった。細胞障害性薬物およびリンカーの抗体への結合によりマウス血清中の安定性に影響は見られなかった。しかし、P3D12-vc-MMAF の暴露は曲線下面積(AUC)の算出より、22.8 μ g-day/mL と P3D12 抗体の 40.5 μ g-day/mL よりも低かった。クリアランスは P3D12 抗体の 0.045mL/day/kg に対し、P3D12-vc-MMAF は 0.088mL/day/kg と高かった。同様に、分布量もリンカー-薬剤の結合に依存していた。これらのデータは、P3D12 抗体に対しリンカー-薬物を結合させても、抗体や薬剤の崩壊を起こすことなく、また P3D12-vc-MMAF の排出が促進されていないことを表している。

次にP3D12抗体、P3D12-vc-MMAF、c-Met-TKI (PHA-665752) の効果を胃癌細胞株MKN-45および非小細胞肺癌細胞株H1975のヌードマウスを用いた異種移植試験により確認した。MKN-45細胞とH1975細胞をそれぞれヌードマウスに移植し、平均腫瘍体積が200mm³-300mm³になるまで観察し、その後マウスを腫瘍体積と体重を基にランダムに各治療群に分けた。c-Met-TKIのPHA-665752は25mg/kg/dayを5日間投与し、それに対応するコントロール群 (溶媒 : 50mM L-lactate [pH4.8] and 10% polyethylene glycol) も同様の投与を行った。その他の治療群では、P3D12抗体 (10mg/kg)、P3D12-vc-MMAF (各3、5、10mg/kg) を、陰性対照として非標的抗体であるRituximab-vc-MMAF (10mg/kg) を単回投与した。

MKN-45 細胞モデルにおいて、P3D12-vc-MMAF は PHA-665752 (25mg/kg/day, 5 doses) と比較し、すべての治療濃度で強力な腫瘍増殖抑制効果を示した (図 11a)。興味深いことに、*in vitro* では効果を示さなかった非修飾の P3D12 抗体も腫瘍増殖抑制効果を示した。この効果の一部は、抗体依存性細胞傷害 (antibody dependent cellular cytotoxicity : ADCC) であることが実験結果より示唆された (図 12)。陰性対照として投与した Rituximab-vc-MMAF が腫瘍増殖抑制効果を示さなかったことから、観察された効果は c-Met を標的とした作用であると考えられる。さらに、P3D12-vc-MMAF の効果を c-Met 遺伝子増幅を持たない非小細胞肺癌細胞株 H1975 でも確認した (図 11b)。H1975 細胞における c-Met の発現は c-Met 遺伝子増幅細胞より低いものの (表 2)、epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子内に変異 (L858R/T790M -EGFR) を持ち、EGFR に対する TKI に耐性を持つ。このモデルにおいて、非修飾の P3D12 抗体と PHA-665752 は効果を示さなかった。一方、P3D12-vc-MMAF は濃度依存に腫瘍増殖抑制効果を示した。これらのデータは *in vitro* 細胞毒性試験の結果と一致する (図 8a,d)。P3D12-vc-MMAF のすべての投与量はマウスで十分に許容され、すべての投与量で 12%を超える体重変化は見られなかった (図 13)。最も体重減少が見られたのは、陰性対照群と非標的 ADC の Rituximab-vc-MMAF 群であり、マウスの腫瘍負荷が高いために体重減少が起きたものと考えられた。



Antibody	Half-time (days)	Area under the curve (ug-day/mL)	Clearance (mL/day/kg)	Volume of distribution (mL)
P3D12	7.84	40.5	0.045	0.51
P3D12-vc-MMAF	7.87	22.8	0.088	1.00

図10： P3D12抗体およびP3D12-vc-MMAFの薬物動態試験

P3D12抗体およびP3D12-vc-MMAFの時間濃度曲線とマウスにおける薬物動態指標。C57BL/6マウスにP3D12抗体およびP3D12-vcMMAFを1mg/kgの濃度で静脈から投与し、経時的に血液を採取した。血清サンプルをELISA法で分析し、P3D12抗体またはP3D12-vcMMAFの濃度を決定した。各薬物動態指標は、WinNonlinソフトウェアを使用して計算した。

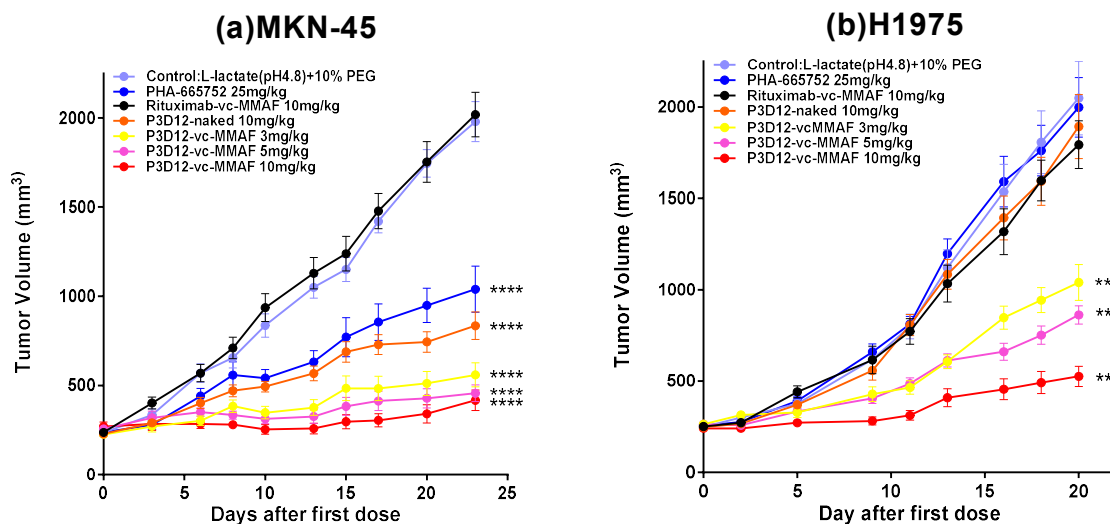


図11：抗c-Met-ADCの*in vivo*での抗腫瘍効果

(a) c-Met高発現胃がん細胞株MKN-45移植モデル、(b) L858R/T790M-EGFR変異を有するc-Met低中発現非小細胞肺癌細胞株H1975移植モデル、におけるP3D12-vc-MMAFの抗腫瘍効果。P3D12抗体は10.0mg/kg、P3D12-vc-MMAFは3.0、5.0、および10.0 mg/kgで静脈内投与し、対照群のRituximab-vc-MMAF 10.0 mg/kgと比較した。c-Met 阻害剤であるPHA-665752は25mg/kg/dayの投与濃度で5日連続、コントロール群（溶媒のみ：50mM L-lactate (pH4.8) /10% polyethylene glycol）も同様の間隔で投与した。各群n = 9、腫瘍体積は平均値±標準誤差で表示した。統計的有意差はtwo-way ANOVA、Bonferroni post hoc test (**** p < .0001 compared to control)で算出した。

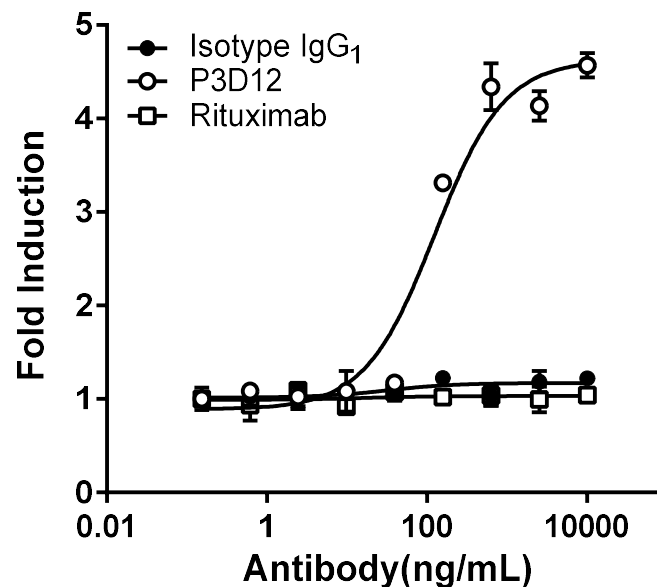
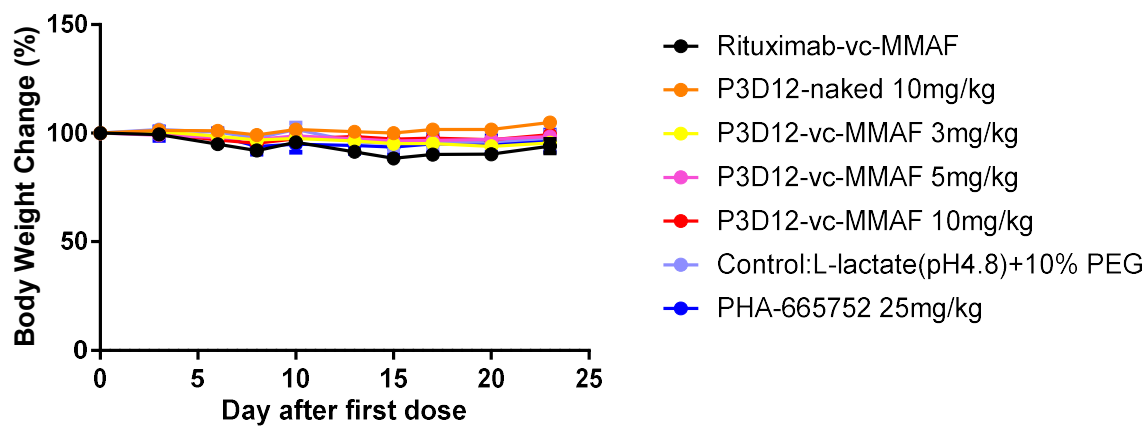


図12：P3D12抗体を用いたADCCアッセイ

MKN-45細胞を使用したP3D12抗体のADCC活性は、ADCC Reporter Bioassay Kit (Promega) を使用して分析した。MKN-45細胞は、マウスIgG₁ アイソタイプ (R&D)、P3D12抗体、Rituximabの各濃度 (0～40μg / mL) でレポーターエフェクター細胞 (エフェクター：ターゲット比 2：1) と反応させた。ADCCアッセイは、製造元の説明に従って測定した。データはPrism 7 ソフトウェア (GraphPad、La Jolla、CA) を使用して分析および曲線のフィッティングを行った。

(a)MKN-45



(b)H1975

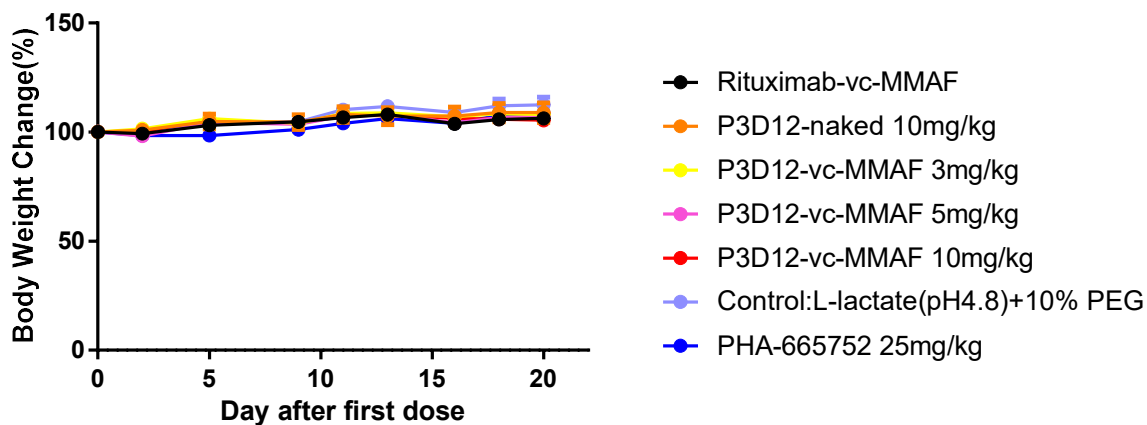


図13 : MKN-45細胞、 H1975細胞移植モデルにおける体重変化

P3D12 抗体、P3D12-vc-MMAF、または c-Met-TKI 投与後の (a) MKN-45 細胞移植モデル (図 11a)、および (b) H1975 細胞移植モデル (図 11b) の体重変化。

2-3 小括

抗 c-Met 抗体による治療上の有効性の幅を広げるために、抗体-薬物複合体 (ADC) である抗 c-Met-vc-MMAF を作製した[15, 16]。今回の ADC 作製において、細胞障害性薬物として細胞膜非透過性のチューブリン阻害剤である MMAF を選択した[17]。MMAF は、荷電したカルボキシル基が細胞内への拡散を妨げるため細胞毒性が低いと考えられているが、ADC によって細胞内に送達されると非常に強力な殺細胞効果を発揮する。予想通り、抗 c-Met-ADC (P3D12-vc-MMAF、P1E2-vc-MMAF) は、c-Met-TKI が効果を示さなかった c-Met 低中発現細胞株を含め、c-Met 陽性細胞株で強力な *in vitro* 細胞毒性を示した。また、TKI とは対照的に、抗 c-Met-ADC は遺伝子増幅の状態に関係なくすべての c-Met 陽性細胞株で細胞毒性作用を示した (表 2)。これは、c-Met 増幅細胞に起因するがん患者のごく一部のみにしか効果を発揮する薬剤がなかったことを考慮すると、本剤により潜在的に治療可能な患者集団を劇的に増加させる可能性を有する[1]。

以上の結果より、抗 c-Met 抗体を ADC 化することにより効果が増強し、既存の TKI よりも治療域が拡大する可能性が示唆された。今後、ヒトへの投与を見据え、薬剤のヒト投与時の免疫原性を低下させるため、P3D12 抗体をヒト化する。

第 3 章 抗 c-Met マウスモノクローナル抗体のヒト化

3-1 ドメインサブクラス変換による抗 c-Met マウスモノクローナル抗体 P3D12 の改良

c-Met は抗がん治療の有望な標的であると考えられているが、抗 c-Met 抗体による治療は上述の通り抗体自体のアゴニスト作用によりその下流シグナルが活性化され、結果的にがん細胞の増殖を促進することにより難しいとされてきた。これまで報告されている抗 c-Met 抗体もアゴニスト作用を持つ[13, 18]。第 1 章において、c-Met シグナルのサロゲートマーカーである ERK のリン酸化活性の弱い抗 c-Met 抗体を作製したが、わずかながらその活性を保持していた。そこで本章では P3D12 抗体のアゴニスト作用をより低下させるため、IgG 重鎖の定常領域のサブクラス変換によりその作用に変化が起きないか確認した (図 3)。IgG₂ のヒンジ領域はそのジスルフィド結合の様式から全 IgG の中でも最も固定化されており、c-Met のアゴニスト作用を生じさせるために必要な受容体の 2 量体化を減少させることが期待される[19]。そこで、ヒト IgG₁ および IgG₂ キメラ型 P3D12 抗体を作製し、元の P3D12 マウス抗体と c-Met の分解活性および ERK のリン酸化活性を比較した。その結果、ヒト IgG₁ キメラ型 P3D12 抗体は P3D12 抗体よりも強い c-Met の分解を示したが (図 14)、ERK のリン酸化活性が増した (図 15)。一方、IgG₂ キメラ型 P3D12 抗体は P3D12 抗体と同等の c-Met 分解活性を示し、かつ興味深いことに ERK のリン酸化を抑制し、高濃度域では阻害を示した。それゆえ、ヒト IgG₂ をその後のヒト化及び特性評価に用いることとした。

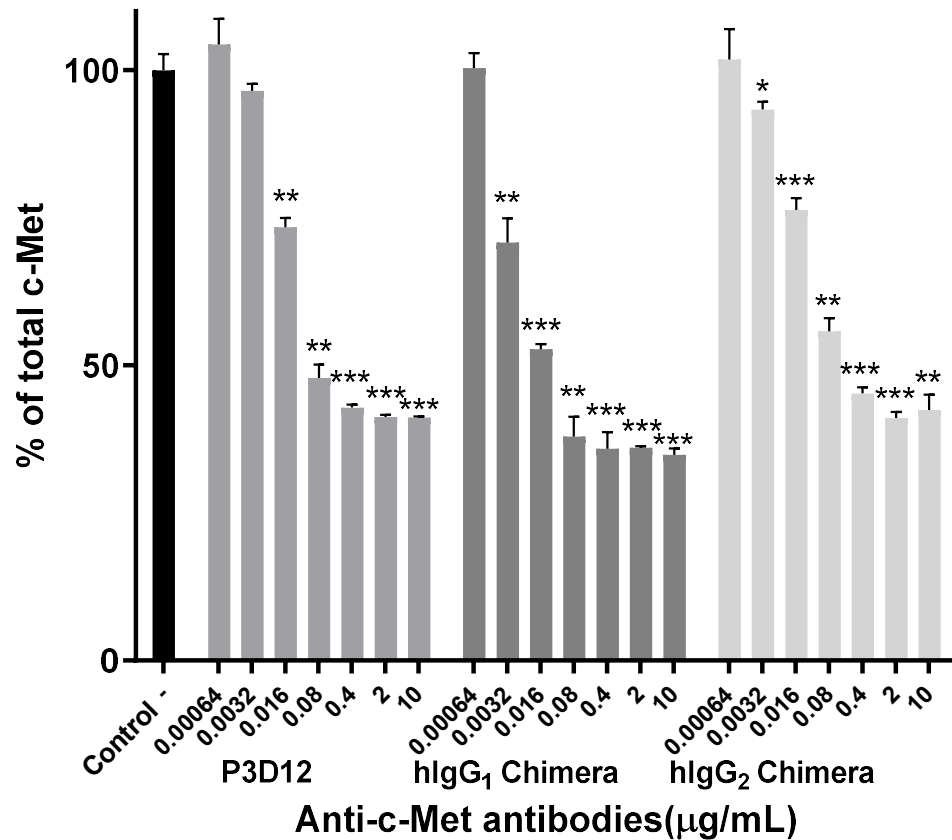


図14：P3D12抗体およびキメラ型P3D12抗体のc-Metの内在化/分解の確認

SNU-16細胞を用いたP3D12抗体およびキメラ型P3D12抗体によるc-Metの分解はSECTOR Imager 2400を用いて測定した。細胞に抗体を添加し、24時間放置した。値は平均値±標準偏差(n=3) % total c-Metで示し、統計的な解析はstudent t-testにより算出した (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$ and **** $p < .0001$ compared to control.)。

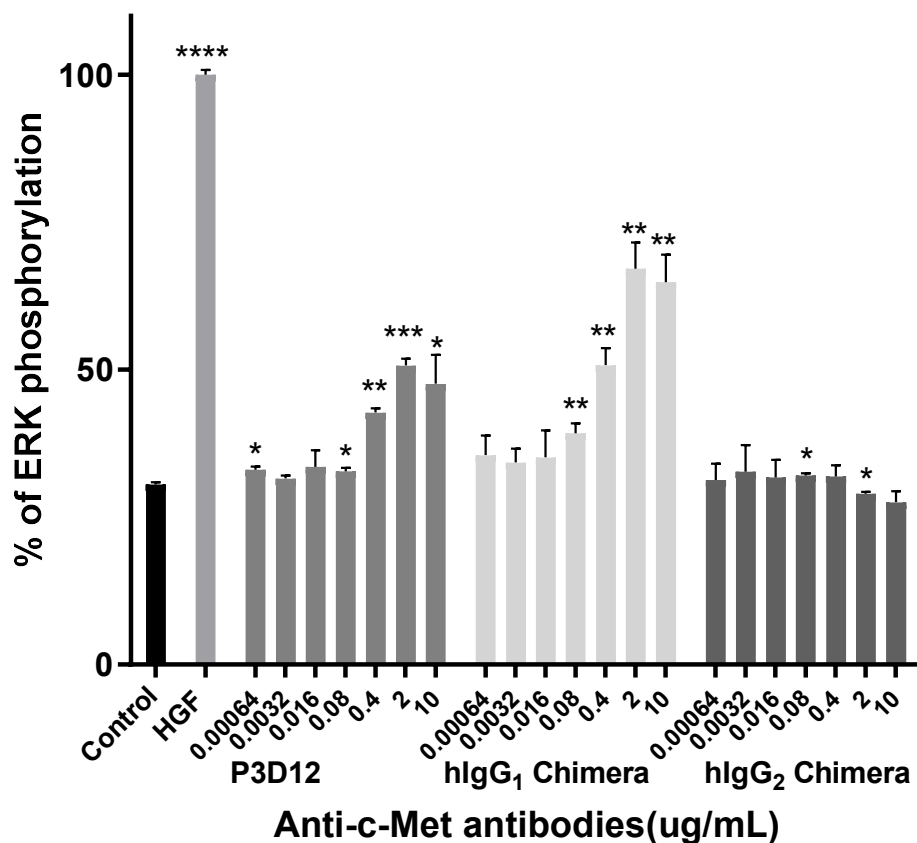


図 15 : P3D12 抗体およびキメラ型 P3D12 抗体のアゴニスト作用の確認 (ERK のリン酸化)

MKN-45 細胞を用いた P3D12 抗体およびキメラ型 P3D12 抗体による ERK のリン酸化は SECTOR Imager 2400 を用いて測定した。細胞に抗体を添加し、15 分間放置した。値は平均値±標準偏差 (n=3) % ERK phosphorylation で示し、統計的な解析は student t-test により算出した (* p < .05, ** p < .01, *** p < .001 and **** p < .0001 compared to control.)。

3-2 抗 c-Met マウスモノクローナル抗体 P3D12 のヒト化および結合活性の評価

マウスに由来するモノクローナル抗体による臨床利用は限られている。その理由として、マウス由来生物製剤に対する免疫応答により生体への安全性と薬物動態に影響を及ぼすことが挙げられる。それゆえ、本章ではマウス由来の抗 c-Met マウスモノクローナル抗体 P3D12 をヒト IgG₂ の配列を基にしてヒト化を試みた。抗 c-Met マウスモノクローナル抗体 P3D12 のヒト化は Padlan らの方法[20]を元に CDR のアミノ酸残基をヒト生殖細胞由来 IgG 配列に移し変えることにより行った (表 3)。重鎖、軽鎖それぞれ 4 つの異なる可変領域の配列を準備し (veneering: ven、grafting of abbreviated CDRs: abb、grafting the whole CDRs onto a composite framework: fra、CDR-grafting: cdr)、P3D12 抗体由来の CDR 領域の配列について IgG₂ を背景としたヒト抗体にクローン化した(材料と方法を参照)。重鎖、軽鎖より可能性のあるすべての組み合わせ(重鎖 4 配列 x 軽鎖 4 配列=16 種類の組み合わせ)の抗体を調製し、それぞれの特性を評価した (表 4)。まず、リン酸緩衝液に対する溶解性を目視で確認した。その結果、4 種の抗体が緩衝液中で沈殿を生じ不溶性を示したため候補から除外した。また、それらの抗体の軽鎖はすべて Kv であった。次に、ヒトとラットの c-Met に対する親和性を組み換えタンパクを用いて ELISA 法により測定した。この試験において親和性を完全に消失したような抗体は見られなかったが、比較した抗体のうち親和性が低い、もしくは抗体発現細胞の生存率の低い 4 つの抗体(fKa、fKc、vKa、vKc)を候補から除外した。候補として残った 8 つの抗体に関して、表面プラズモン法により組み換え c-Met に対する親和性を確認した (表 4)。その結果、数種の抗体が親抗体である P3D12 と同等もしくは優れた親和性を示した。特に、cKf 抗体はヒト、ラット両 c-Met に対して P3D12 抗体よりもわずかながら高親和性を示した。これにより、ヒト化 P3D12-cKf をリード抗体と決定し、今後、hD12 抗体として

進めることとした。

(a) 重鎖可変領域

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
P3D12	QVQLQDSGAE	LAKPGASYKMS	CRAS	GYTFTISYMMH	HWVKQRP	GGGLDW	IQYIKPSTDNTEYNOKFKDKKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVVYICARSYGNPPLMDVWGQGTIVTVSS
abb	QVQLVOSGAE	VKKPGASYKVS	CKAS	GYTFTISYMMH	HWVKAAP	GGGLDWMGI	YIKPSTDNTEYAKFQDRVTLTADKSTIAYMELSSLRSEDTAVVYICARSYGNPPLMDVWGQGTIVTVSS
fra	QVQLQDSGAE	VKKPGASYKVS	CKAS	GYTFTISYMMH	HWVKQRP	GGGLDWI	YIKPSTDNTEYNOKFKDKRVTLTADKSTIAYMQLSSLTSEDTAVVYICARSYGNPPLMDVWGQGTIVTVSS
ven	QVQLVOSGAE	VAKPGASYKMS	CKAS	GYTFTISYMMH	HWVKAAP	GGGLDWI	YIKPSTDNTEYNOKFKDKKATLTADKSTIAYMQLSSLRSEDTAVVYICARSYGNPPLMDVWGQGTIVTVSS
cdr	QVQLVOSGAE	VKKPGASYKVS	CKAS	GYTFTISYMMH	HWVKAAP	GGGLDWI	YIKPSTDNTEYNOKFKDKKATLTADKSTIAYMELSSLRSEDTAVVYICARSYGNPPLMDVWGQGTIVTVSS

(b) 軽鎖可変領域

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
P3D12	QIVLTQSPAIMSASPGGEKVTLC	SSASSSVTSN	YLTWYQQQKPGSSPKLWIY	STSNLASG	VPARFSGSGSGTSYSLTIS	SMEEAEDAASYFC	HOWSSYPPTFGSGTKLEIKR
abb	QIVLTQSPATLSISPGGERATLSC	SSASSSVTSN	YLTWYQQQKPGSSPRLIY	STSNLASG	VPARFSGSGSGTDYTLTISR	LEPEDFASVFC	HOWSSYPPTFGSGTKLEIKR
fra	QIVLTQSPATLSISPGGERATLSC	SSASSSVTSN	YLTWYQQQKPGSSPKLLIY	STSNLASG	VPARFSGSGSGTSYTLTIS	SEAEADAASYFC	HOWSSYPPTFGSGTKLEIKR
ven	QIVLTQSPAIMSASPGGERVTLSC	SSASSSVTSN	YLTWYQQQKPGSSPRLIY	STSNLASG	VPARFSGSGSGTSYTLTISR	MEPEDAASYFC	HOWSSYPPTFGSGTKLEIKR
cdr	QIVLTQSPATLSISPGGERATLSC	SSASSSVTSN	YLTWYQQQKPGSSPRLIY	STSNLASG	VPARFSGSGSGTSYTLTISR	LEPEDFASVFC	HOWSSYPPTFGSGTKLEIKR

表 3：P3D12 抗体のヒト化に際して行ったアミノ酸置換

ヒト化した抗体は”abb”、”fra”、”ven”、”cdr”のそれぞれ独立したヒト化された重鎖と軽鎖の可変領域の組み合わせにより作製した。上記の表は P3D12 抗体から置換したアミノ酸を赤字で示している。

(a) 重鎖可変領域、(b) 軽鎖可変領域。FR：Framework、CDR：complementarity determining region、相補性決定領域。J：J 領域。

Clone	Heavy chain	Light chain	Solubility	human c-Met		rat c-Met	
				ELISA EC ₅₀ (μg/mL)	SPR kD(nM)	ELISA EC ₅₀ (μg/mL)	SPR kD(nM)
P3D12				0.05	0.88	0.38	15.6
aKa	a	Ka	-	0.06	0.86	0.40	26.5
aKf		Kf	-	0.11	0.57	0.33	23.3
aKv		Kv	insoluble	0.09	n/a	0.43	n/a
aKc		Kc	-	0.10	0.66	0.41	38.1
fKa	f	Ka	-	0.13	n/a	1.88	n/a
fKf		Kf	-	0.13	0.36	0.74	29.5
fKv		Kv	insoluble	0.09	n/a	0.39	n/a
fKc		Kc	-	0.11	n/a	0.77	n/a
vKa	v	Ka	-	0.04	n/a	0.86	n/a
vKf		Kf	-	0.04	0.32	0.24	8.3
vKv		Kv	insoluble	0.05	n/a	0.29	n/a
vKc		Kc	-	0.04	n/a	0.48	n/a
cKa	c	Ka	-	0.09	0.39	1.29	29.0
cKf		Kf	-	0.05	0.26	0.33	7.0
cKv		Kv	insoluble	0.05	n/a	0.32	n/a
cKc		Kc	-	0.07	0.87	1.00	31.2

表4：ヒト化P3D12抗体のヒトおよびラットc-Metに対する親和性の確認

P3D12抗体を含む、選択されたヒト化P3D12抗体のELISA法による親和性、および表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance：SPR）法による速度論的結合定数を測定した。

3-3 *in vitro* および *in vivo* におけるヒト化抗体 hD12 の特性評価

ADC が細胞毒性を発揮するためには、細胞表面上の標的に結合した後に内在化し細胞内で適切にリンカーが切断され薬物を放出しなければならない。hD12 抗体は c-Met に対し高親和性を示すが（表 4）、この項では hD12 抗体の内在化と標的依存的に細胞毒性を発揮するのかを評価した。

まず、c-Met 陽性細胞株である EBC-1 細胞を用いて免疫蛍光法により内在化を観察した。hD12 抗体を添加し、4℃で 30 分放置後、抗ヒト IgG-AF488 抗体と反応させ顕微鏡下で観察した。その結果、細胞表面のみで蛍光が確認され、hD12 抗

体が細胞表面上の c-Met に結合したことが示唆された (図 16 左図)。一方、hD12 抗体を添加し、37°C 30 分放置後、抗ヒト IgG-AF488 抗体と反応させ顕微鏡下で観察したときには、細胞内に蛍光の塊が観察された (図 16 右図)。これは hD12 抗体が細胞表面の c-Met に結合後、細胞内に内在化したことを示唆している。

次に、hD12 抗体の効果の増強を図るため、PBD (pyrrolobenzodiazepine) 2 量体と複合体を形成させた ADC である hD12-vc-PBD を調製した。細胞毒性試験では c-Met の高発現株である MKN-45 細胞、低中発現株である H1975 細胞、および c-Met 非発現細胞株である SNU-1 細胞で評価した (図 17)。MKN-45 細胞において、hD12-vc-PBD は PBD 単独よりも 20 倍高い細胞毒性を発揮した。また、ヒト IgG₂ の非標的抗体として使用した Denosumab-vc-PBD は細胞毒性を示さなかった。一方、c-Met 非発現細胞株である SNU-1 細胞においては、PBD は単独で細胞毒性を示したものの、hD12-vc-PBD は作用を示さなかった。H1975 細胞においても、hD12-vc-PBD の添加で細胞毒性を発揮したが、MKN-45 細胞と比較し効果は低く、生存率を示す有効性も 60-70%程度にとどまった。これは MKN-45 細胞と比較し、H1975 細胞の c-Met の発現量が低いことが原因であると考えられる。これらのデータは、hD12-vc-PBD が c-Met 発現細胞選択的に効果を発揮したことを示しており、またその効果は MKN-45 細胞と H1975 細胞の比較より、c-Met の発現量に依存していると考えられる。

さらに MKN-45 細胞を用いて hD12-vc-PBD の *in vivo* での抗腫瘍効果を評価した (図 18)。被検体としてリード ADC である hD12-cKf-vc-PBD およびの 2 つ派生物(hD12-fKf-vc-PBD、 hD12-cKa-vc-PBD)、陰性対照として Denosumab-vc-PBD を使用した。腫瘍体積が平均 250-300mm³になったところで各検体を 0.25、1mg/kg (Denosumab-vc-PBD は 1mg/kg のみ) で尾静脈より

単回投与した。試験期間中すべてのマウスは重篤な体重減少($\geq 20\%$)、および顕著な毒性の兆候を示すことはなかった（データ非公表）。3種すべての被検体ADCは同様の効果を示し、1mg/kg投与グループは腫瘍の退縮を、0.25 mg/kgグループは有意に腫瘍増殖抑制作用を示した。また、陰性対照群は腫瘍の増殖に影響を及ぼさなかった。

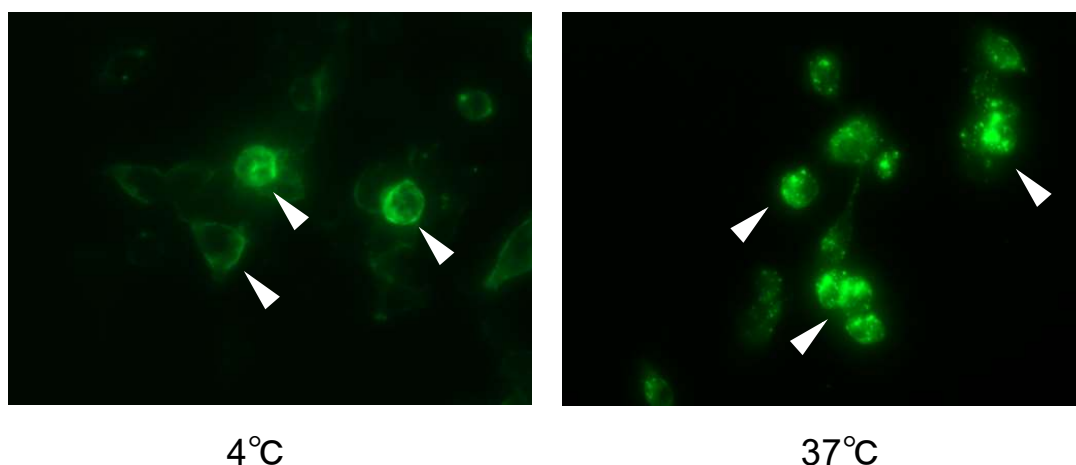


図16：顕微鏡下でのhD12内在化の評価。

EBC-1細胞にhD12を加え、4°Cまたは37°Cで30分間放置した後、AF488に結合した抗ヒトIgG抗体を使用してhD12を検出することにより評価した。示した図は代表的な蛍光画像である。左図（4°C）内に示した白の矢頭は細胞表面の蛍光像を、右図（37°C）内に示した白の矢頭は細胞内で凝集している蛍光像（内在化）を示している。

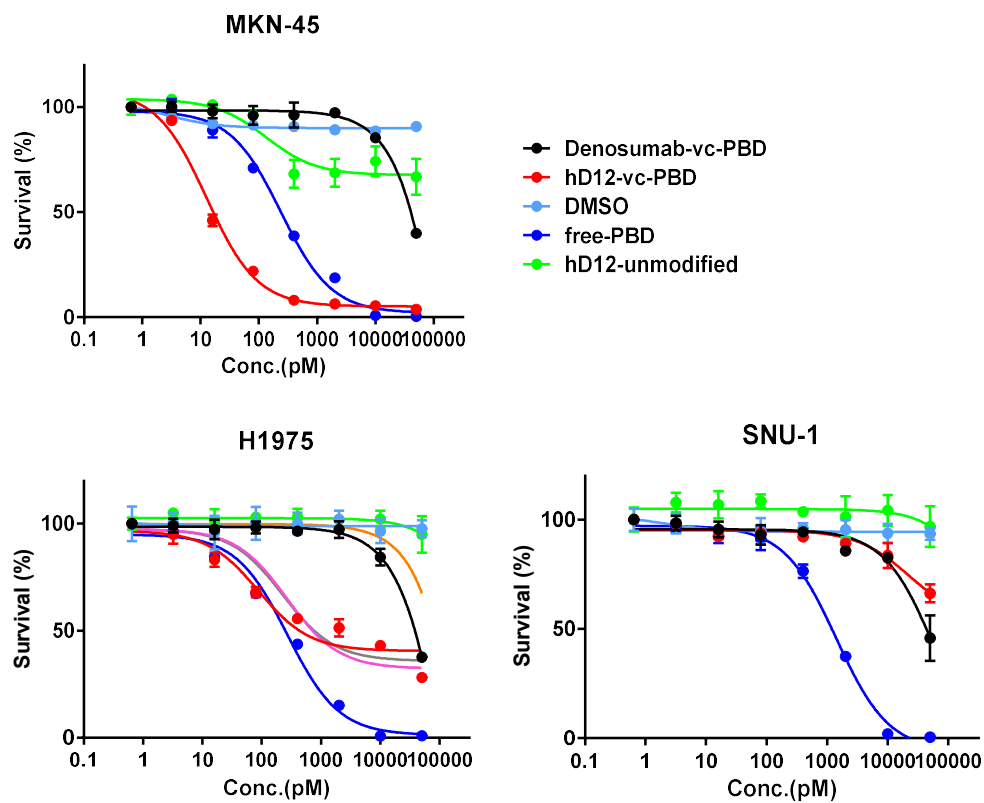


図17 : hD12-vc-PBDの*in vitro*細胞毒性と特異性試験

各薬剤に対する感受性を c-Met 高発現細胞株 MKN-45、c-Met 低中発現細胞株 H1975、c-Met 陰性細胞株 SNU-1 で評価した。

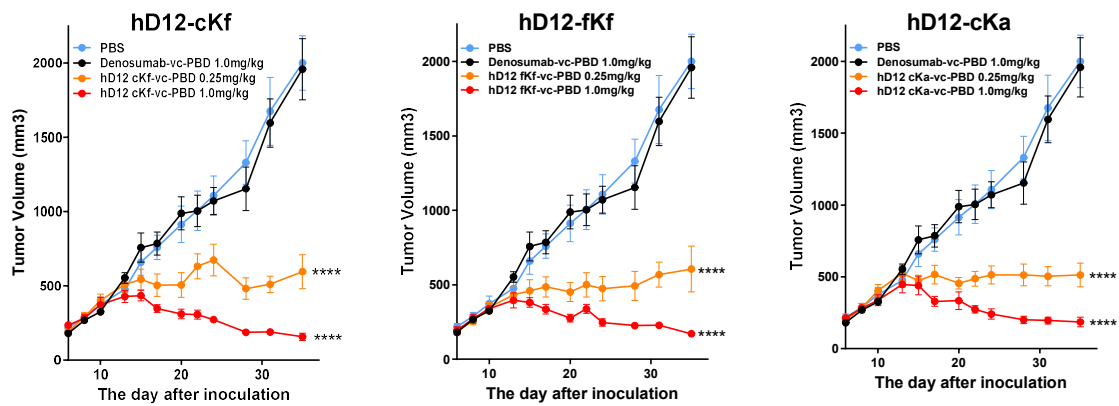


図18： hD12-vc-PBDの*in vivo*での抗腫瘍効果

c-Met高発現胃癌細胞株MKN-45移植モデルにおけるヒト化抗c-Met抗体 hD12- (cKf, fKf, cKa) -vc-PBDの抗腫瘍効果。ADCは0.25および1.0mg/kgで1回静脈内投与し、対照群 (Denosumab-vc-PBD : 1.0mg/kg) と比較した。各群 $n = 8$ 、腫瘍体積は平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計的有意差はtwo-way ANOVA、Bonferroni post hoc test (**** $p < .0001$ compared to control)で算出した。比較のため、各グラフのPBS、 Denosumab-vc-PBD群は同じデータを示している。

3-4 小括

抗 c-Met 抗体マウスモノクローナル抗体 P3D12 のヒト化にあたり、基本となる IgG のサブタイプを決定した。今回選択したヒト IgG₂ はこれまでの報告からヒト IgG₁ よりもアゴニスト作用が低下すること[21]、FcγR への結合能を失うことからオフターゲット効果が低下すること、以上の 2 点が推定上の利点として挙げられる。また、ヒト化においては、ヒトおよびラットへの親和性を減少させることなくヒト IgG 配列に導入することに成功した。ADC に供する抗体に必要な機能である標的への結合後に起こる細胞内への内在化を顕微鏡下で確認した。また、hD12 を PBD2 量体と結合させることで ADC 化し、細胞毒性試験により標的依存的な作用を示し、また動物試験においても有効性を示した。今後、本抗体を使用し、製剤としての安定化を検討する。

第 4 章 抗体-薬物複合体 (ADC) 製剤の安定性向上への検討

前章までに c-Met に対する抗体の作製およびそのヒト化、さらに ADC にすることで抗腫瘍効果が高まることを証明した。抗体-薬物複合体は抗体、共有結合性リンカー、細胞障害性作用を持つ低分子薬物から構成されており、各成分自体の安定性は基よりその結合部位、血中安定性など臨床応用するためにはその製剤の安定性を向上させることが必要である。この章では抗体と結合させる最適なリンカー-薬物の選択、抗体とリンカー-薬物の結合部位を特定する検討を行い製剤の安定化を図る。

4-1 hD12 抗体に適したリンカー-薬物の選択

ADC は製品の保管中および体内の血液循環中に安定に存在する必要がある、かつ ADC ががん細胞に内在化した後に抗体と薬物の間で適切に切断が起こり、活性薬物が放出される必要がある。これらの理由から、その安定性に重要な役割を担う、hD12 抗体と結合させる構造と特性が異なる 3 種類のリンカー-薬物を評価した (図 19)。すべてのリンカー-薬物にはカテプシンにより切断されるバリニン-アラニンジペプチドトリガーが存在するが、スペーサー、抗体との結合部位、親水基の有無、および固定化される毒素が異なる。3 つのリンカー-薬物の有効性を、c-Met 陽性細胞である非小細胞肺癌株 H1975 および H1373 のマウスを用いた異種移植試験により確認した (図 20、21)。2 つの異なる濃度 (0.125mg/kg および 0.5mg/kg) で、単回静脈内投与を行い、腫瘍の体積と重量を週に 3 回測定した。すべての投与量に対しマウスは忍容性を示し、有意な体重減少は観察されなかった (データ未公表)。hD12-SG3259 は、試験したすべてのサンプルの濃度で最も高い有効性を示した。hD12-SG3249 は、hD12-SG3259 よりも低用量群

(0.125mg/kg) でわずかに有効性が低いことが確認された。 hD12-SG3227 は、低用量群で最も効果が低かった。

hD12 抗体は、ラット c-Met に結合親和性を持つ抗 c-Met マウスモノクローナル抗体から開発された。ラットの最大耐量 (MTD : maximum tolerated dose) を決定するために、2 つの主要なリンカー-薬物 (SG3249 および SG3259) の体重の変化 (図 22) および臨床血液検査値 (図 23) を評価した。被検ラットに対して 2.0、1.5、1.0 または 0.5mg/kg 濃度で hD12-SG3249 または hD12-SG3259 を尾静脈に単回静脈内注射を行った。その結果、2.0mg/kg hD12-SG3259 投与群のすべてのラットが、重度の毒性のために死亡または屠殺された。1.5mg/kg hD12-SG3259 投与群も毒性症状を示し、2mg/kg hD12-SG3259 投与群の後に死亡した。一方、hD12-SG3249 を投与されたラットは、いずれの投与濃度においても 21 日間の試験期間中に異常は観察されなかった。血液学的検査において、hD12-SG3259 の高用量 (2.0 および 1.5mg/kg) 投与群では、肝酵素 (AST、ALT) の活性が低下し、リンパ球および血小板数が大幅に減少していたが (図 23)、すべての hD12-SG3249 投与群は忍容性が高く、重大な有害事象や死亡は記録されなかった。これは、SG3249 が hD12 抗体との組み合わせで高い忍容性を持つことを示唆している。

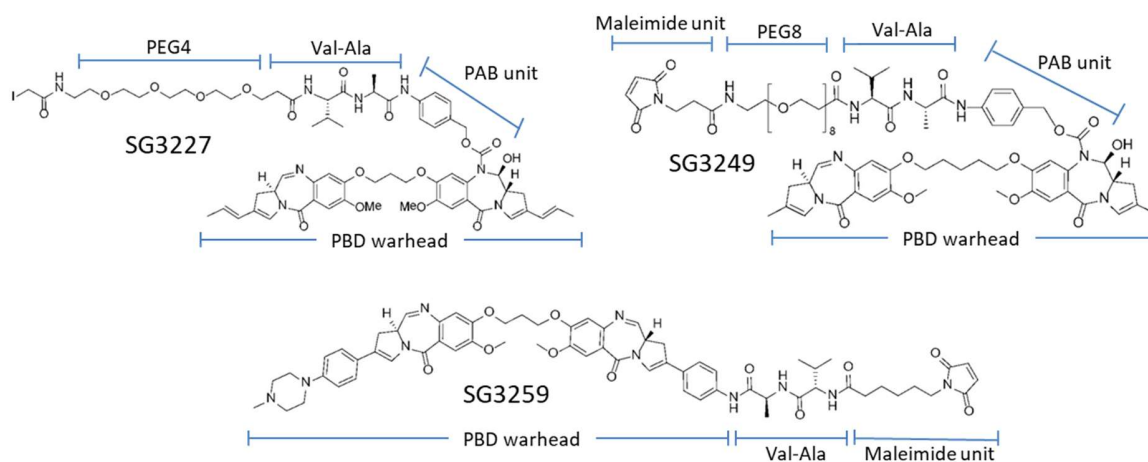


図19：リンカー-薬物SG3227、SG3249およびSG3259の概略図

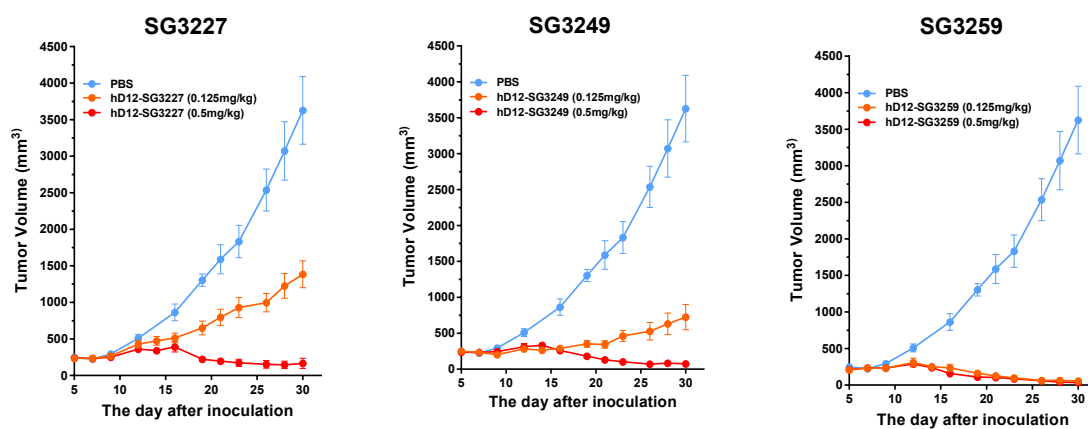


図20：c-Met低中発現非小細胞肺癌細胞株H1975移植モデルにおけるhD12-SG3227、-SG3249 および-SG3259の抗腫瘍効果。

ADCは0.125および0.5mg/kgで1回静脈内投与し、対照群（PBS）と比較した。各群n = 10、腫瘍体積は平均値±標準誤差で表示した。比較のため、各グラフのPBS群は同じデータを示している。

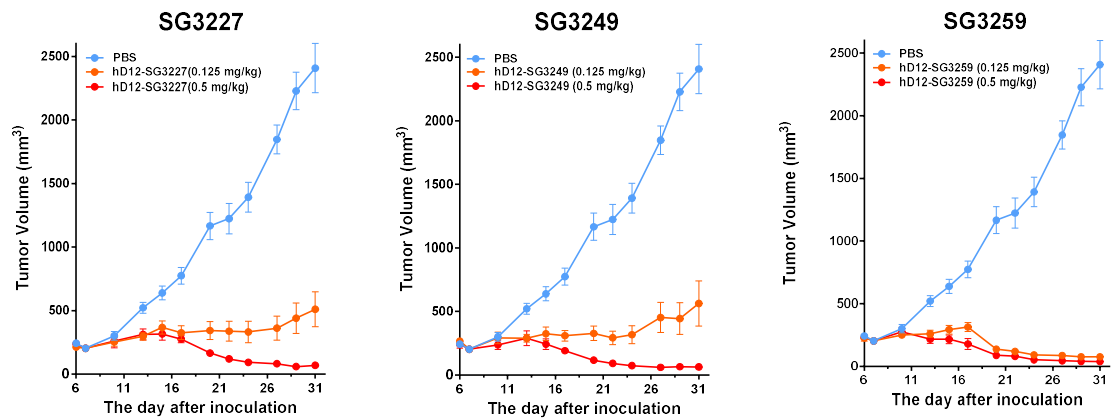


図21：c-Met低中発現非小細胞肺癌細胞株H1393移植モデルにおけるhD12-SG3227、-SG3249 および-SG3259の抗腫瘍効果。

ADCは0.125および0.5mg/kgで1回静脈内投与し、対照群（PBS）と比較した。各群n = 10、腫瘍体積は平均値±標準誤差で表示した。比較のため、各グラフのPBS群は同じデータを示している。

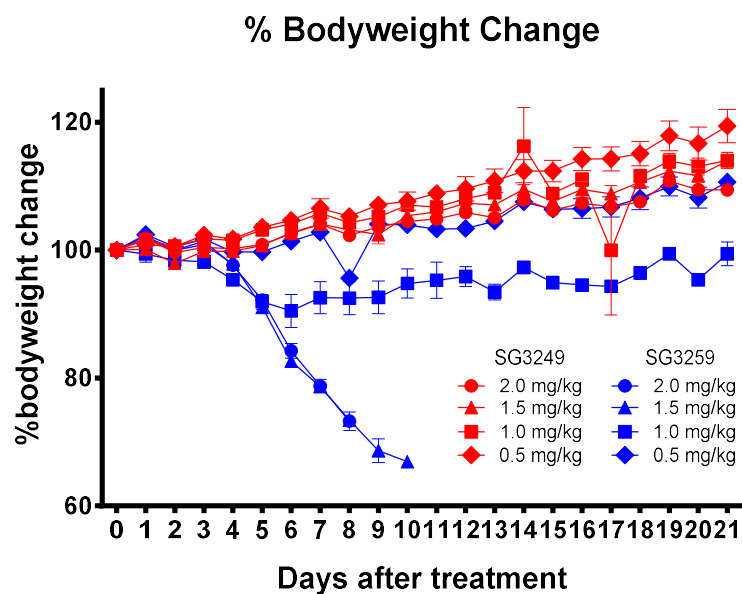


図22：ラットを用いた忍容性試験（体重測定）

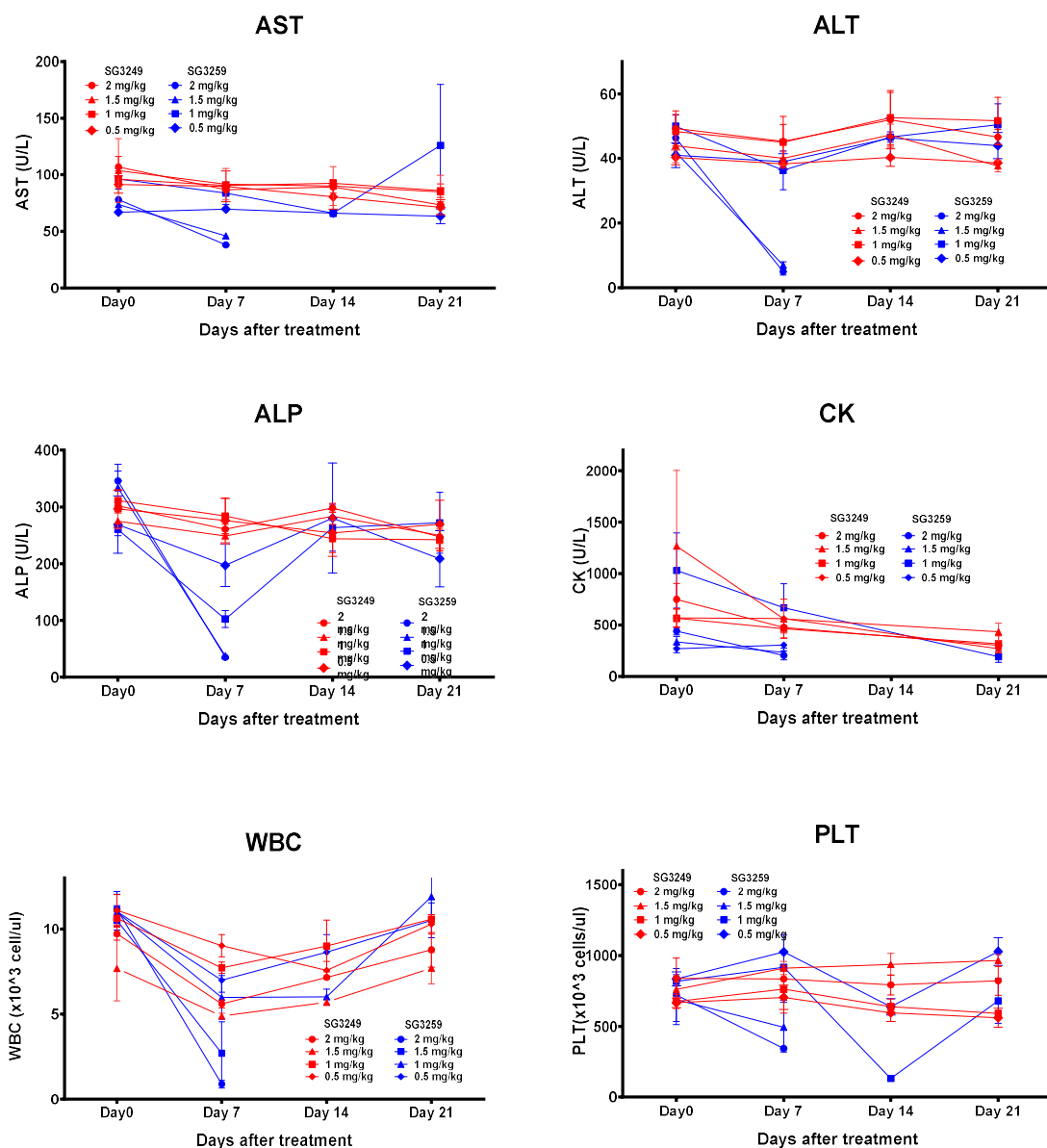


図23-1：臨床血液検査。肝臓酵素（AST、ALT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、クレアチニンキナーゼ（CK）、白血球数（WBC）、血小板数（PLT）、好中球（Neutrophils）、リンパ球（Lymphocytes）、赤血球数（Red Blood Cells）、およびヘモグロビン（Hemoglobin）

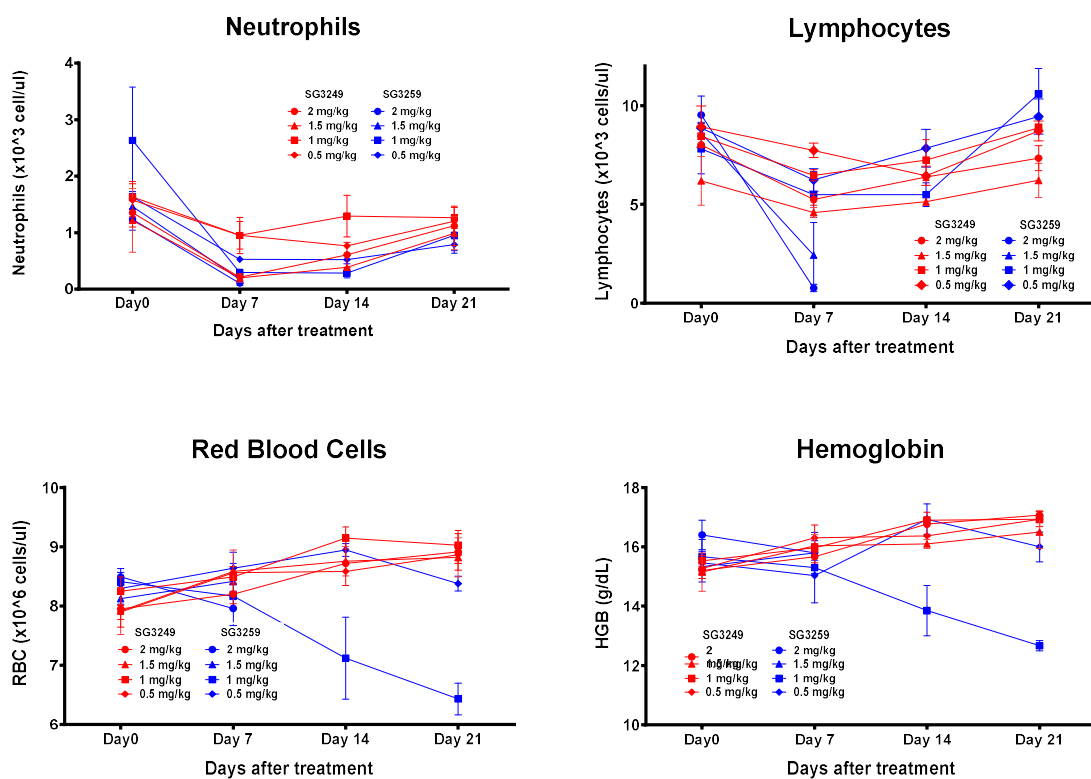


図23-2：臨床血液検査。肝臓酵素（AST、ALT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、クレアチニンキナーゼ（CK）、白血球数（WBC）、血小板数（PLT）、好中球（Neutrophils）、リンパ球（Lymphocytes）、赤血球数（Red Blood Cells）、およびヘモグロビン（Hemoglobin）

4-2 抗体とリンカー-薬物の特異的な結合部位の決定

通常、抗体とリンカー-薬物を結合させる場合、還元により抗体内に存在するジスルフィド結合もしくはリジン残基のアミノ基を一時的、また部分的に開裂させ、その部位にリンカー-薬物を結合させる。しかし、この方法では平均的な DAR (薬物対抗体比) を各実験回で等しくなるように実験条件を設定することになるが、結合部位や個々の抗体に対するリンカー-薬物の結合数は確率論や偶然性に任せることになり、製造時に製剤の均一性や安定性を確保することに困難が伴う。一般に、部位特異的な抗体とリンカー-薬物の結合はより均質な薬剤を取得できるため、確率的 (ランダム) に結合させた ADC と比較し、安定性および忍容性の向上、更に *in vivo* での PK 指標が改善するなどいくつかの利点がある[22, 23]。そのため、DAR および結合部位の不均一性を低減させ、より安定した結合を得るために、部位特異的にリンカー-薬物を抗体に結合する方法を実施した。

導入部位は hD12 抗体の重鎖定常領域を使用し、抗体発現ベクター中の指定する部位のアミノ酸残基を遺伝子組み換え (point mutation) によりシステイン残基に置換した (V282C、T289C、V422C)。置換の確認はシーケンス解析で行った。SG3249 (図 19) を導入されたシステイン残基に部位特異的に結合させた。その結果、各サンプルの DAR は非常に均一であり、抗体あたり平均 DAR は 1.9 であった (データ非公表)。

最初に、3 つの部位特異的 ADC の有効性を c-Met 陽性細胞である非小細胞肺癌株 H1975 のマウスを用いた異種移植試験により確認した (図 24)。その結果、高用量群 (0.5mg/kg) では、全ての部位特異的 ADC は、抗体に確率的 (ランダム) に結合させた SG3249 (hD12-stoch-SG3249) と同じ腫瘍退縮効果を示した。また、低用量群 (0.125 mg / kg) では、2 つの部位特異的 hD12 ADC (T289C、V422C) は、hD12-stoch-SG3249 と同じ腫瘍増殖阻害を示したが、hD12-V282C-

SG3249 のみ効果が低かった。

次に、ラットの体重変化を測定することにより、すべての部位特異的 ADC の忍容性を評価した。その結果、すべてのサンプルで忍容性が高く、毒性に起因すると思われる体重減少は見られなかった（図 25）。臨床血液検査値において、部位特異的 hD12-SG3249 の単回投与ではすべての投与群で肝臓酵素（AST、ALT）およびクレアチンキナーゼ（CK）値の変化は検出されなかった（図 26）。血液学的検査では、すべての投与群で好中球が大幅に減少したが、7 日目以降は回復した。さらに、白血球数（WBC）、血小板数（PLT）、リンパ球（Lymphocytes）、赤血球数（Red Blood Cells）、およびヘモグロビン（Hemoglobin）においても毒性を示す変化は観察されなかった（図 26）。

最後に、ラットを用いた薬物動態試験により血清中の安定性を評価した（図 27）。図中の表は、ノンコンパートメント解析によって計算された薬物動態指標を示している。V282C、T289C および V422C 血清のラットの循環半減期は、それぞれ 11.4 日、18.0 日および 14.0 日だった。さらに、他の指標は大きな違いを示さなかった。

4-3 小括

抗体の部位特異的にリンカー-薬物を導入するため、抗体に人工的にシステイン残基を導入し、その結合に適した部位を決定した。SG3249 を重鎖の定常領域上に部位特異的に結合にさせることにより得られた均一な ADC は、ラットにおいて高い安定性と長い半減期を示した。c-Met はラットの一部の正常組織（肝臓、肺、消化管）でも発現しているが、主要な臨床所見や顕著な体重減少がなく、ラットでの忍容性も良好であった。今回の結果を総合的に判断し、T289C を部位特

異的なリンカー-薬物導入の変異部位として決定した（図 28）。以上の結果より、hD12-T289C-SG3249 を新規抗 c-Met-ADC として取得することに成功した（図 29）。

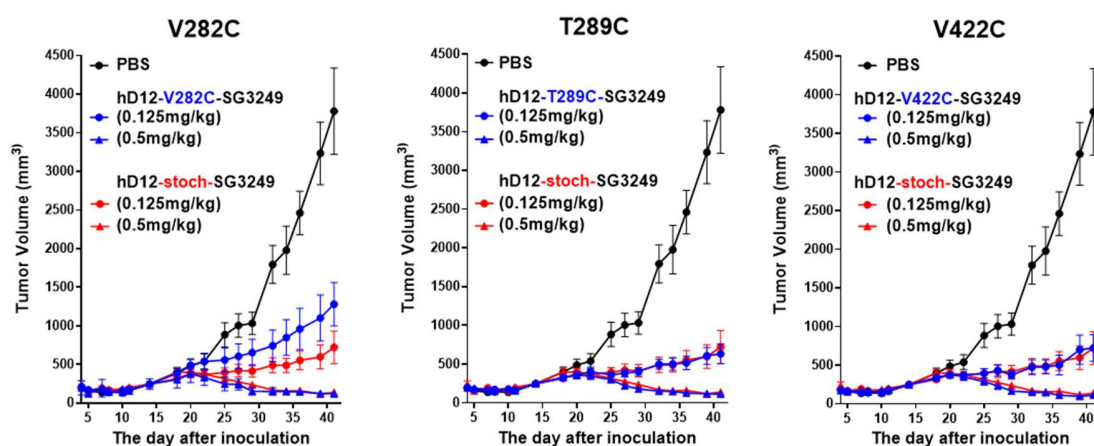


図24：部位特異的な抗体とリンカー-薬物の結合に関する特性評価と比較

c-Met低中発現肺がん細胞株H1975移植モデルにおける部位特異的 hD12-SG3249（V282C、T289C、V442C）の抗腫瘍効果。ADCは0.125および0.5mg/kgで1回静脈内投与し、対照群（確率的結合：stochastic conjugation）と比較した。各群n = 8、腫瘍体積は平均値±標準誤差で表示した。比較のため各グラフのPBS群および対照群（確率的結合：stochastic conjugation）は同一データを示している。

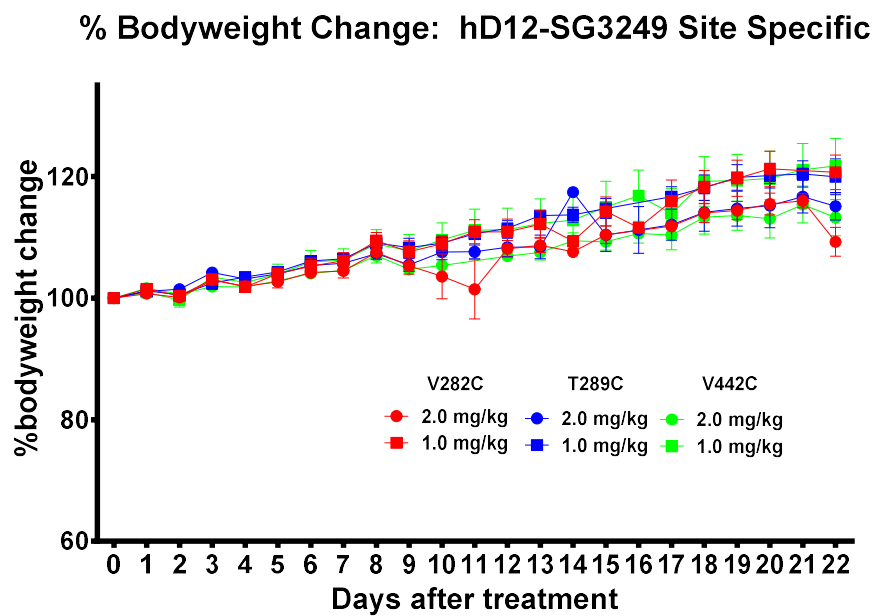


図25：部位特異的ADCのラット忍容性試験（体重測定）

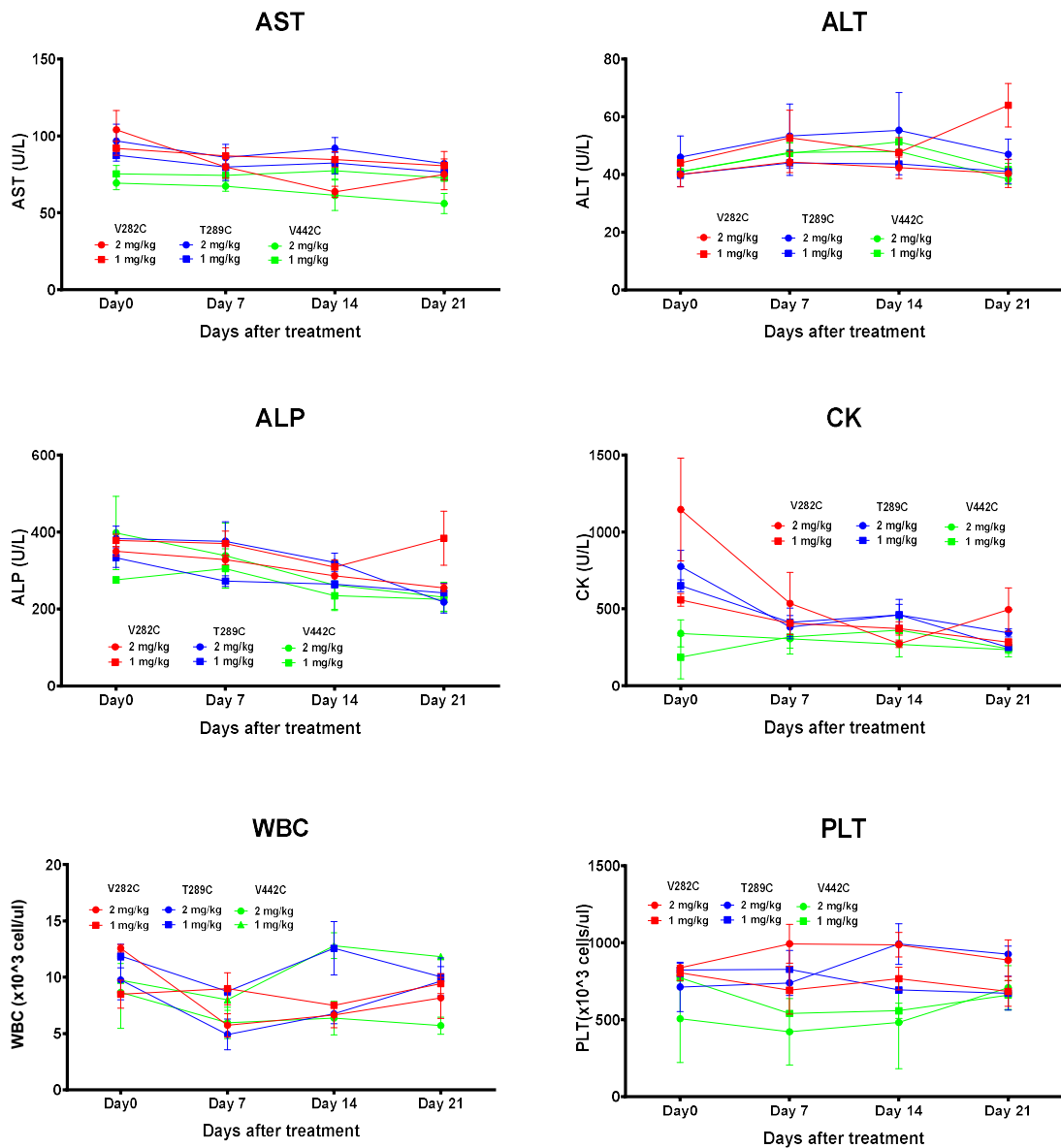


図26-1：部位特異的な抗体とリンカー-薬剤の結合に関する特性評価と比較
臨床血液検査。肝臓酵素（AST、ALT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、クレアチニンキナーゼ（CK）、白血球数（WBC）、血小板数（PLT）、好中球（Neutrophils）、リンパ球（Lymphocytes）、赤血球数（Red Blood Cells）、およびヘモグロビン（Hemoglobin）

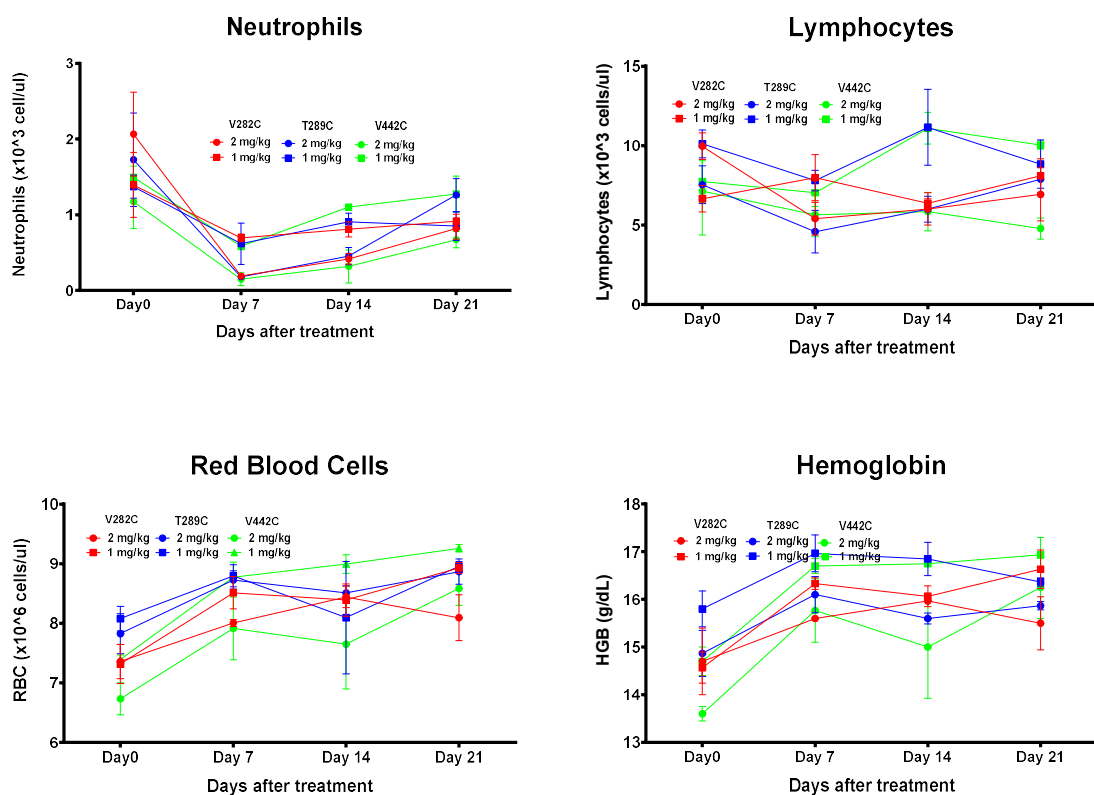
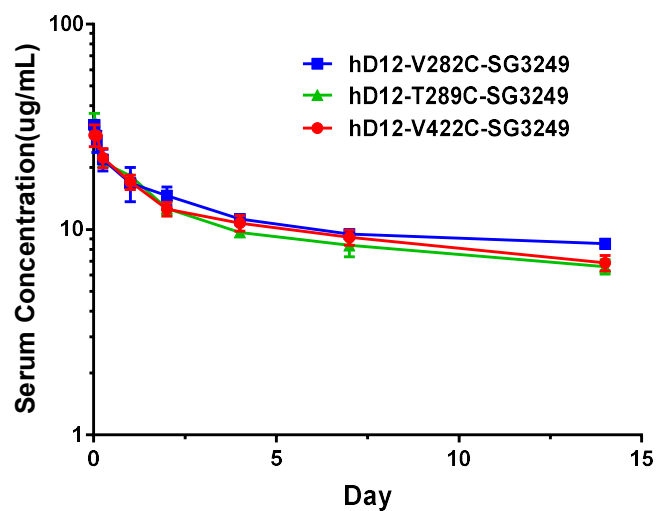


図26-2：部位特異的な抗体とリンカー-薬剤の結合に関する特性評価と比較
臨床血液検査。肝臓酵素（AST、ALT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、クレアチニンキナーゼ（CK）、白血球数（WBC）、血小板数（PLT）、好中球（Neutrophils）、リンパ球（Lymphocytes）、赤血球数（Red Blood Cells）、およびヘモグロビン（Hemoglobin）



Antibody	Half-time (days)	AUC_LAST (ug-h/mL)	CL_F_OBS (mL/h/kg)	Cmax (ug/mL)
hD12-V282C-SG3249	11.4	3777	0.0007	32.9
hD12-T289C-SG3249	18.0	3152	0.0007	34.9
hD12-V422C-SG3249	14.0	3712	0.0007	32.1

図27：部位特異的リンカー-薬物結合型hD12-SG3249の薬物動態試験

各ADCの時間濃度曲線とラットにおけるそれらの薬物動態指標。ラットに各ADCを1mg/kgの濃度で静脈から投与した。血清サンプルをELISA法で分析し、血清中のサンプル濃度を決定した。薬物動態指標は、WinNonlinソフトウェアを使用して計算した。

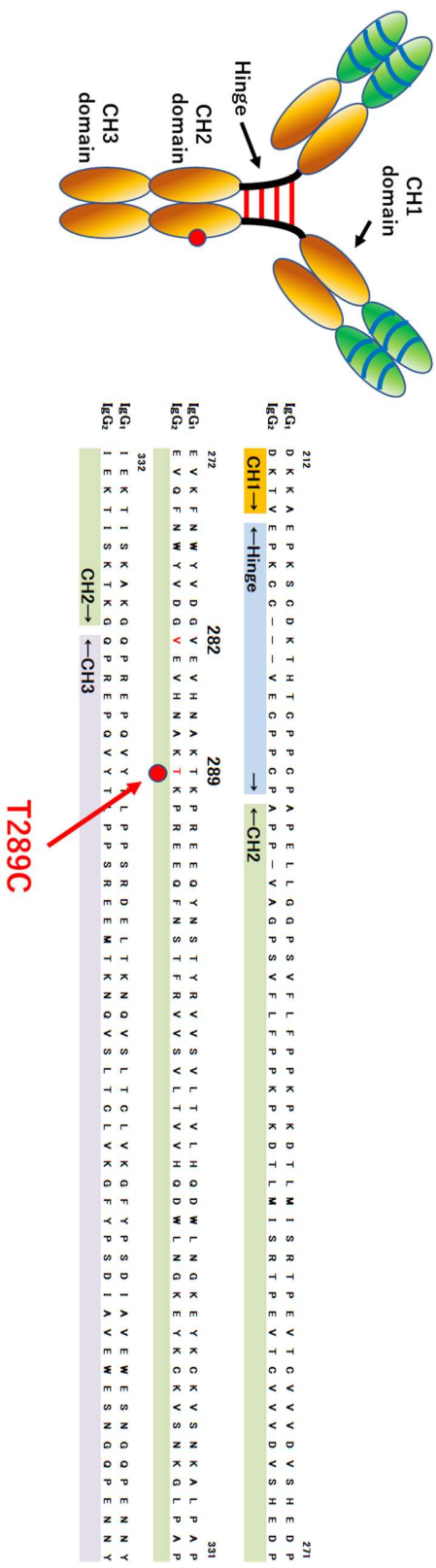


図 28 : 部位特異的にリンカー-薬物を結合させるため Cysteine (C) 残基を導入した変異部位 SG3249 を結合させるため IgG₂ の 289 位の Threonine (T) を Cysteine (C) に置換した。
図は変異部位が導入された領域である CH2 ドメインを中心にアミノ酸配列を記している。

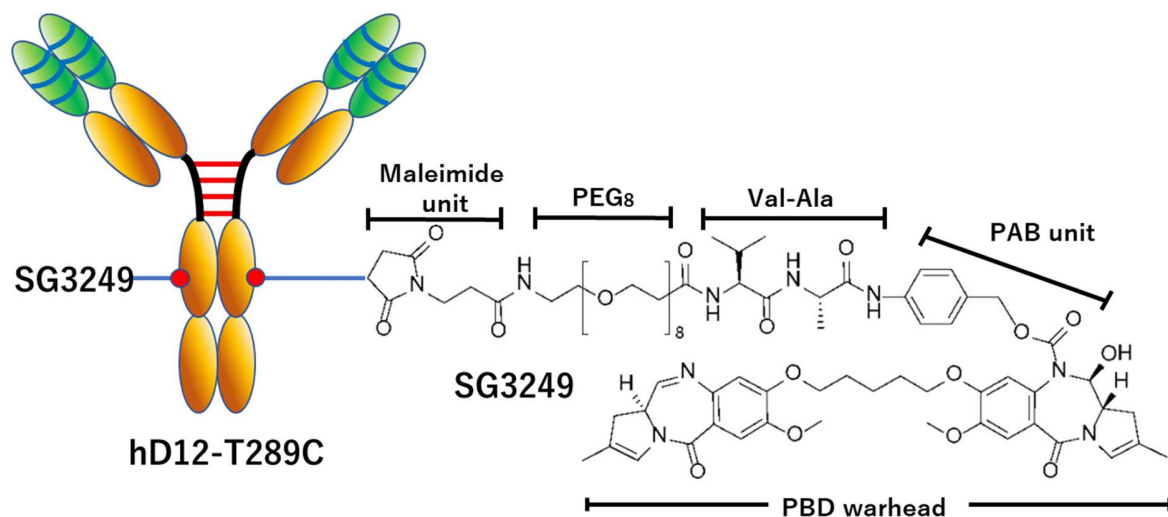


図 29 : hD12-T289C-SG3249 の概略図

抗 c-Met 抗体 P3D12 をヒト化した hD12 の CH2 ドメインに存在する 289 位の Threonine (T) を Cysteine (C) に置換し、その部位特異的にリンカー-薬物 SG3249 を結合させた。

考察（総括と展望）

c-Met の増幅と過剰発現は複数のがん種（卵巣がん、胃がん、NSCLC、肝細胞がん）で観察されており[24]、そのようながん化に関与する c-Met の異常は、がんの薬物療法に対する抵抗性や手術後の再発を含めた予後不良に関与している。また、そのような c-Met の異常は血管新生や細胞増殖のシグナル伝達経路の相互関連が報告されている EGFR 及び vascular endothelial growth factor (VEGF) を標的とした治療への耐性に関与している[25-27]。そのため、過去数年の間に c-Met 阻害剤[28]および抗体[29]の開発が進められてきた。しかし、これらの臨床試験の結果より c-Met を阻害することで効果が得られる患者層の特定が困難であることが明らかになってきた。例えば、抗 c-Met 抗体 Onartuzumab (Genentech, Inc., 一価 : one-arm の抗 c-Met 抗体) と c-Met-TKI の Tivantinib (別名 : ARQ197) は、後期 NSCLC の第 3 相試験で有効性を示すことができなかった[11, 30, 31]。最近の臨床データから、c-Met エクソン 14 スキップ変異を伴う NSCLC に対し有効性を期待されている新規 c-Met-TKI の Tepotinib が臨床試験を実施中であるが、過剰発現や遺伝子増幅など複数の遺伝子変異環境下で臨床効果を実証することは困難である[32]。それゆえ、c-Met を標的とする治療法の抗腫瘍活性を拡大するには多大な努力が必要になる。

我々は第一章で c-Met の分解を誘導し、低いアゴニスト活性しか持たず、かつヒトのみならずサル、ラットの c-Met にも交差性をもつ抗 c-Met マウスモノクローナル抗体 P3D12 を取得した。また第二章では、抗 c-Met 抗体による治療上の有効性の幅を広げるために取得した抗 c-Met 抗体を使用して抗体-薬物複合体 (ADC) を作製し、c-Met-TKI が効果を示さなかった c-Met 低中発現細胞株を含め c-Met 発現細胞株で強力な *in vitro* 細胞毒性を示した (図 8)。抗 c-Met-ADC の有効性に影響する重要なパラメーターは、受容体数、内在化率、細胞内輸送、

および薬物の放出である。今回取得したデータは、c-Met と *in vitro* EC₅₀ の間に
関係があることを示唆している（表 2）。抗体を添加したことによる c-Met タンパ
クの分解は、H596 細胞および Hs746T 細胞では比較的 low（図 9）、これらの細
胞株においては c-Met 遺伝子の変異に起因する Cbl 分解経路の障害が内在化の低
下に関与していると考えられた。その結果、ADC の有効性もこれらの細胞株で低
下していた。さらに、細胞を非修飾の抗 c-Met 抗体で処理した場合、H441 細胞、
N87 細胞および H596 細胞で細胞増殖の促進が観察された（図 8e、8f、8g）。こ
のような特徴をもつ細胞には、より強力なリンカー-薬物を選択するか、内在化さ
れる ADC の量を増やすことが医療効果を高めるための有効な手段となり得る。

本研究では、*in vitro* での細胞毒性試験で P3D12-vc-MMAF と c-Met-TKI
（PHA-665752）の間で効力の違いを示したが、その結果は *in vivo* 異種移植モデ
ルでも同様であった（図 11）。MKN-45 細胞を用いた異種移植モデルでは、P3D12-
vc-MMAF の 3、5、10mg/kg の単回投与が 25 mg/kg/day c-Met-TKI（PHA-665752）
の 5 回投与よりも強い腫瘍増殖抑制作用を示した。興味深いことに、10mg/kg の
非修飾 P3D12 抗体も c-Met-TKI（PHA-665752）と同様に、MKN-45 細胞移植
モデルで有意な抗腫瘍効果を示した。この効果の一部は、抗体依存性細胞傷害
（antibody dependent cellular cytotoxicity : ADCC）であることが示唆される
（図 12）。現在、ADC に用いる抗体が ADCC 活性を保持することについて 2 つ
の異なる意見がある。抗 c-Met 抗体が ADCC 活性を有することは有効性を高め
るのに有益である[33]、逆に ADCC 活性の欠如が潜在的な副作用を回避する可能
性がある[34]、というものである。ヒト IgG₂ をバックグラウンドとする hD12 はエ
フェクター効果の誘導能が低く ADCC 活性も低いと考えられるが、今回の試験結
果では抗 c-Met-ADC は ADCC 活性がなくても十分な効果を発揮していた。また、
c-Met は正常組織（結腸、肝臓、肺など）でも発現する因子であり、潜在的な標

的毒性を排除できない。そのため、ADC に用いる抗体に ADCC 活性のような毒性薬物以外の細胞障害機能を持たせるか否かは今後議論が必要である。

c-Met は NSCLC の腫瘍増大に重要な役割を果たしていることが知られており、c-Met および EGFR の両経路が NSCLC での受容体交差活性化に相互に関与していることがわかっている[35, 36]。H1975 細胞は遺伝子増幅を持つことなく野生型 c-Met を発現しているが、EGFR 遺伝子内に L858R / T790M の二重変異を有するヒト NSCLC 細胞株である。また、これらの変異が Erlotinib や Gefitinib などの EGFR-TKI に対する耐性の原因であると考えられている[37]。それゆえ、この細胞株は TKI 耐性を克服するための新しい標的薬を開発するためのモデルとして広く使用されている[38, 39]。H1975 細胞移植モデルにおいて、P3D12-vc-MMAF は用量依存的な腫瘍増殖抑制作用を示したが、c-Met-TKI (PHA-665752) はまったく効果を示さなかった (図 11b)。このデータは、変異型 EGFR を持ち、EGFR 特異的 TKI に対する耐性を持つがん細胞に対しても ADC が EGFR 経路以外の作用機構により効果を示したことを表しており、低分子医薬で耐性を獲得したがん細胞にも作用を示すという仮説を支持する[40]。今回のデータは TKI 耐性株に対する効果を示した最初の有望な試験結果ではあるが、がん細胞が耐性を獲得する機構の解明に関しては今後の課題である[41, 42]。現在の主要な考察として、TKI に対し後天的に耐性を獲得する原因は、TKI の患者への継続的な曝露による過剰な下流シグナル伝達によるゲノムの変異惹起と経路中毒による恒常活性化であるといわれている。c-Met および EGFR に対するモノクローナル抗体は TKI の欠点を克服するために使用されるが、これらの薬剤自体も耐性メカニズムを起こしやすい[43, 44]。一方、ADC は目的の組織や細胞に的確にデリバリーできるため、投与濃度が比較的低く、薬剤耐性は抗体単独もしくは低分子阻害剤単独よりも耐性が生じにくいことが期待されている。そのような ADC の薬効発揮

メカニズムからも、ADC はがんに対し新たな治療や医療価値を届けられる可能性を持っている。

取得した抗 c-Met マウスモノクローナル抗体を使用し、臨床応用可能な薬剤作製の検討を行った。まず、キメラ化した P3D12 抗体を用いた試験で、ヒト化の際の IgG の背景として IgG₂ を選択した。ERK のリン酸化アッセイにおいて、ヒト IgG₁ キメラ体ではアゴニスト活性が増加した (図 15)。一方、ヒト IgG₂ キメラ体は検出可能なアゴニスト活性を示さなかった。この違いがどのような機構によるものかは完全には証明されていないが、IgG₂ ヒンジ領域に余分なジスルフィド結合が存在して柔軟性が低下していることに関連していると考えられている[19][21]。

マウス抗体を臨床で使用する際の問題の 1 つは、免疫応答の発生、いわゆるヒト抗マウス抗体 (Human Anti-Mouse Antibodies : HAMA) の発生であり、これは体内 (血中) から速やかなマウス抗体の排泄をもたらす。がん治療薬の最初のモノクローナル抗体であるリツキシマブは、1997 年に非ホジキンリンパ腫に対して米国 FDA によって承認された[45]。リツキシマブは、大部分の B 細胞リンパ腫の表面に見られる CD20 抗原に対するキメラ抗体である。リツキシマブは非常に改良された抗体だが、これらの「キメラ」抗体には依然としてかなりの数のマウス由来のアミノ酸残基が含まれていた。今回のヒト化の過程においても複数の重鎖と軽鎖の組み合わせを評価したが、構造、結合親和性、およびエピトープ認識の間の関係は変化に富んでいた (表 4)。非常に少数のアミノ酸置換でさえ溶解性と結合親和性の違いを示した。

P3D12 抗体をヒト化した抗 c-Met 抗体である hD12 抗体を *Streptomyces refuineus* [46] から単離されたアントラマイシンの誘導体である合成ピロロベンゾジアゼピン (PBD) 二量体と結合させることで作用の増強を計画した。PBD 分

子は DNA を架橋し、細胞分裂を阻害することによって細胞死を引き起こす作用を持ち、現在いくつかの候補薬剤が臨床試験中である[47]。これまでのところ、PBD を含む ADC である SGN-CD33A、SGN-CD70A、SC16LD6.5 の 3 つの候補が現在臨床試験に臨んでおり[48-50]、それらの *in vitro* 細胞毒性試験の結果によると、PBD は MMAF よりも優れた効力を示している。PBD は膜透過性の化合物であるため、透過性の低い化合物と比較し、傍観者効果 (bystander effect) による追加の細胞毒性を引き起こすことが期待できる。我々の試験結果でも、元の P3D12-vc-MMAF が 10mg/kg で腫瘍の増殖抑制にとどまったのに対し(図 11a)、hD12-vc-PBD は 1mg/kg の用量で腫瘍の退縮作用を示した (図 18)。このことより、hD12-vc-PBD は元の P3D12-vc-MMAF よりも作用が強力であるといえる。

上記のように PBD の強力な毒性のため、血液循環中の抗体と薬剤の結合、つまりリンカー-薬物の安定性が非常に重要になる。多くの ADC がペプチドを基本としたリンカーを使用しているが、本研究でも細胞内の消化酵素により薬物の放出が容易で、かつ血液中での安定性が高いことが知られているバリン-アラニンを基本としたリンカーを選択した[51, 52]。このタイプのペプチドリリンカーは、リソソーム内の腫瘍特異的プロテアーゼの 1 つとして知られているカテプシン B によって加水分解される。今回の結果では SG3249 が最良の候補であり、より優れた腫瘍増殖抑制を示し毒性作用は観察されなかった。一方 SG3259 は、マウス異種移植モデルにおいて投与量 0.5mg/kg まではもっとも高い有効性を示したが(図 20)、ラットでは 1.0、1.5、2.0 mg / kg の用量で毒性が観察された (図 22)。SG3249 と SG3259 の主な違いは、リンカー内のスペーサー領域に存在する polyethylene glycol (PEG) による親水性の増大である (図 19)。これまでの報告により、PEG が ADC の溶解性と安定性、PK の安定性を改善し、異種移植試験における効力を高めることが知られている[53-56]。さらに、ADC の疎水性を

低下させるとリンカー-薬物の溶解性が向上し、ADC の凝集も低下、および PK と治療指数が向上することが知られている[57]。これは、SG3259 がラット血清中で不安定であったため、ADC の分解により放出された遊離薬物によって非特異的毒性を引き起こしたことを示唆している。これらのデータは、リンカー部位が ADC の機能に多大な影響を与えることを示している。

従来の ADC は、抗体の表面に存在するリジンまたはシステイン残基を介してリンカー-薬物を偶然性や確率論に任せて結合させていた[58]。一般的には抗体内に存在するシステイン残基を還元することで結合に使用していたが、鎖間のジスルフィド結合がなくなると抗体が不安定になり、有効性が失われ、薬物動態が低下し、オフターゲット毒性が増加することが指摘されている[59]。そのため、これまでにいくつかの部位特異的な結合方法が開発されている[58]。ADC の不均一性を低減するための独自のアプローチの 1 つは、抗体へシステイン残基を追加で導入する方法であり、この方法では鎖間ジスルフィド結合を未修飾のままにすることができる[60, 61]。今回の試験では抗体内の 3 つの部位にシステイン残基を導入した後、リンカー-薬物の結合を行い、複数の試験で比較した。V282C 変異のみが異種移植モデルで他 2 種 (T289C、V442C) より低い有効性を示したが、毒性についてはすべての部位特異的 ADC において異常はみられなかった。c-Met はほとんどの組織で発現しており、クリアランス、標的への曝露など hD12 抗体の分布に影響を与える可能性がある。hD12 抗体はラット c-Met と交差反応性があるため、標的を介したクリアランスがその PK に寄与する可能性がある。そのためラットを用いた PK 試験を行ったが、標的を介した β 相でのクリアランスは見られなかった(図 27)。これにより、今回選択した SG3249 の部位特異的 (T289C) な結合は安定性と効力の発揮に貢献したと考えられる。

以上をまとめると、今回の研究において *in vitro* および *in vivo* の両方で標的指向の腫瘍増殖阻害効果を発揮するヒト化抗 c-Met 抗体-薬物複合体である hD12-T289C-SG3249 を創製した (図 29)。重要なことに、ラットの忍容性および毒性試験は、hD12-T289C-SG3249 が潜在的に治療可能な血清レベルを達成できる用量で安全に静脈内投与できる可能性を示唆している。また、今回のデータは hD12-T289C-SG3249 が c-Met 過剰発現腫瘍の治療に有望な治療法になる可能性のみならず、c-Met の発現が低い腫瘍でさえも標的にすることができることを示唆している。本研究後、非ヒト霊長類による毒性試験、容量設定試験、患者由来細胞組織を用いた異種移植モデル試験での効果を確認したのち、固形腫瘍を対象とした臨床第 1 相試験を実施中である。

材料と方法

抗体の作製

ヒト IgG Fc 領域に融合させたヒト c-Met 細胞外ドメイン組み換えタンパクをマウスに免疫し、そのマウスより B 細胞を採取した。その B 細胞を SP2 細胞と融合させてハイブリドーマを形成させた。これらのハイブリドーマを半固形培地上に播種しコロニーを形成させ、それぞれのコロニーを 96 ウェルプレート上に独立に採取し、培養した。その培養上清を用いて、ELISA 法および FACS 解析により c-Met に親和性を持つハイブリドーマを選択した。

ELISA 法によるハイブリドーマスクリーニング

マイクロタイタープレート (Nunc) に 2 μ g/mL の組み換えヒト c-Met/Fc (自家調製) を加え、4℃で一昼夜放置した。SuperBlock (Thermo Fischer Scientific) により blocking を行った後、ハイブリドーマの上清を添加し、室温に 1 時間放置した。洗浄後、ヤギ抗マウス IgG-Fc 抗体 (Jackson Immunology#209-005-098) を加え、室温に 20 分放置した。c-Met に親和性を持つ抗体は TMB 基質 (KPL) により検出した。反応は 2N H₂SO₄ により停止させ、SPECTROstar Nano microplate reader (BMG LABTECH) を用いて 450nm の吸光度を検出した。

FACS解析による抗体依存性c-Metの内在化および分解の検出

ハイブリドーマの上清を c-Met 陽性細胞に添加し、37℃で 18 時間放置した。洗浄後、細胞をリン酸緩衝液/2%牛胎児血清アルブミン (FBS) /0.05% アジ化ナトリウム/5mM EDTA に懸濁した。ヤギ抗ヒト c-Met 抗体 (R&D, #AF276) を添加し、氷上で 1 時間放置した。洗浄後、Phycoerythrin (PE) 融合抗ヤギ抗体 (R&D,

#F0107) を加えた。さらに洗浄し、BD Accuri (BD Bioscience) により検出した。

定量的フローサイトメトリー解析

各種細胞株の細胞表面上のc-Met発現量を定量化するため The Quantum Simply Cellular Microbeads kit (Bangs Laboratories, IN, USA) を使用した。c-Met受容体数の解析では、Alexa Fluor 488を融合させた抗c-Met抗体を使用した。サンプルはthe BD Accuri flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて解析した。各測定サンプルは少なくとも5,000以上の生細胞を評価した。死細胞は7-Amino-Actinomycin D (7-AAD, Sigma, St. Louis, MO, USA) で染色されたものを除外した。数値化はQuick Cal v2.3 software (Bangs Laboratories, IN, USA) を用いて蛍光強度の中央値をantibody binding capacity (ABC) unitsに変換することにより行った。

c-Met 分解アッセイ、ERK リン酸化アッセイ

サンプル内c-Met (SNU-16細胞) およびリン酸化ERK (MKN-45細胞) の量はMeso Scale Discovery (MSD) 社のSECTOR Imager 2400 (Gaithersburg, MD) により測定した。SNU-16細胞は抗c-Met抗体を添加し、24時間放置した。MKN-45細胞は抗c-Met抗体を添加し、15分間放置した。サンプルは以下のMSD社の試薬を用いて解析した。Phospho/Total Met whole cell lysate kit (total c-Met) 、 Phospho/Total ERK1/2 whole cell lysate kit (p-ERK 1/2 and total ERK 1/2) 。分析法は製造者による説明書に従った。

細胞株

MKN-45細胞はDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen、Germany (DSMZ) より入手した。SNU-620細胞はKorean Cell Line Bank、S. Korea (KCLB) より入手した。SNU-1細胞、SNU-16細胞、H441細胞、H596細胞、H1373細胞、H1975細胞、N87細胞、Hs746T細胞、4MBr-5細胞はAmerican Tissue Type Collection (ATCC) より入手した。すべての細胞株の培養、維持は販売元の指示に従い、通常RPMI-1640/2mM グルタミン/10%FBS培地中、37℃、5% CO₂下で培養した。

細胞増殖アッセイ

抗 c-Met 抗体添加による細胞増殖への影響には、HGF の生化学検査に用いられる 4MBr-5 細胞 (CCL-208 : ATCC、Manassas、VA) を使用した。4MBr-5 サル上皮細胞の増殖には HGF など c-Met シグナルを刺激することが必要である。4MBr-5 細胞を F-12K 培地 (ATCC、Manassas、VA) /5%FBS 中、96 ウェルプレート (Corning、Inc.、Corning、NY、U.S.A.) の 1 ウェルあたり 2×10^3 細胞を播種した。5 時間放置後、希釈した抗ヒト c-Met 抗体および陽性対照である HGF (R&D Systems、Inc.、Minneapolis、MN) を上記記載の培地に加えた。5 日間培養後、Celltiter-Glo (Promega、Madison、WI) を加え、Perkin Elmer EnSpire multimode plate reader (Perkin Elmer、Waltham、MA) により ATP を検出した。

ELISA 法による c-Met 種交差性試験

マイクロタイタープレート (Nunc) に5μg/mLの組み換えヒト、ラット、マウス、イヌ、サルc-Met/Fc (Sino Biological Inc) をそれぞれ加え、4℃で一昼夜

放置した。SuperBlock (Thermo Fisher Scientific) によりblockingを行った後、抗c-Met抗体を添加し、室温に1時間放置した。洗浄後、HRP融合ヤギ抗マウスIgG-Fc抗体 (Jackson Immunology、#209-005-098) を加え、室温に20分放置した。各種c-Met に親和性を持つ抗体はTMB基質 (KPL) より検出した。反応は2N H₂SO₄により停止させ、EnSpire multimode plate reader (Perkin Elmer、Waltham、MA) を用いて450nmの吸光度を検出した。

抗体とリンカー-薬物の結合

抗 c-Met 抗体 (P3D12、 P1E2) および Rituximab へのリンカー-薬物の結合は以下の方法で行った。PBS/50mM ホウ酸 (pH8.0) 緩衝液に溶解した抗体に BondBreaker (Thermo Fisher Scientific) を添加し、37℃で2時間放置した。緩衝液の置換後 (Zeba Spin Desalting Columns、Thermo Fisher Scientific)、還元された抗体溶液にリンカー-薬物溶液 (MC-Val-Cit-PAB-MMAF、CONCORTIS、San Diego、CA) を添加し、氷上に30分放置した。放置後、過剰のシステインにより未反応のジスルフィド結合切断部を吸収した。緩衝液の置換後、必要により限外ろ過膜を用いて抗体を濃縮した。タンパクと薬物の濃度は分光分析により行った。抗体あたりに結合した薬物の数は P3D12-vc-MMAF、P1E2-vc-MMAF、Rituximab-vc-MMAF に対しそれぞれ 1.8、2.0、2.0 であった。

hD12- (cKf、fKf、cKa) および Denosumab へのリンカー-薬物の結合は上記と同様の方法で行った。使用したリンカー-薬物 (Val-Cit-PBD: TCRS-374、TCRS、San Diego、CA) は PBD 2 量体を含むもので、抗体あたりに結合した薬物の数は hD12-cKf-vc-PBD、hD12-fKf-vc-PBD、hD12-cKa-vc-PBD、Denosumab-vc-PBD に対しそれぞれ 1.9、2.3、1.6、2.6 であった。

In vitro 細胞毒性試験

細胞は 10% FBS が含まれている通常培地中で希釈、96 ウェルプレート上に播種し、陰性対照、抗体、ADC、もしくは c-Met 阻害剤 PHA-665752 (Sigma Aldrich) と共に 5 日間培養した。細胞の生存率は Celltiter-Glo (Promega, Madison, WI) を加え、Perkin Elmer EnSpire multimode plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA) により ATP を検出した。50% 阻害濃度 (IC₅₀) は Prism 7 Software (GraphPad, LaJolla, CA) を用いて、non-linear regression analysis using sigmoid dose response curve により算出した。

マウスを用いた薬物動態 (PK) 試験

P3D12 抗体および P3D12-vc-MMAF の薬物動態は C57/BL6 マウスを用いて評価した。1mg/kg の試験試薬を C57/BL6 マウス (n=5) の尾静脈より投与した。血液サンプルの回収はマウスの尻尾より以下の時間間隔で行った (静脈注射後: 5 分、2 時間、6 時間、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日)。血液はヘパリンにコートされたチューブに回収し、遠心 (14,000 x g, 5 分間) により血清成分を分離した。血清中の P3D12 抗体および P3D12-vc-MMAF の濃度は ELISA 法により測定した。ヒト組み換え c-Met タンパクでプレートをコートした。SuperBlock solution (Thermo Fisher Scientific) でブロッキングを行った後、血清サンプルを加え、室温にて 1 時間放置した。洗浄後、goat anti-mouse IgG-HRP conjugate (Thermo Fisher Scientific) を加え、室温にて 20 分間放置した。結合した P3D12 抗体 と P3D12-vc-MMAF は TMB 基質 (KPL) より検出した。反応は 2N H₂SO₄ により停止させ、EnSpire multimode plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA) を用いて 450nm の吸光度を検出した。ノンコンパートメント薬物動態指標は WinNonlin ソフトウェア (Pharsight, Mountain View, CA) により算出した。

マウスを用いた *in vivo* 異種移植試験

すべての動物実験はTANABE RESEARCH Laboratories U.S.A., Inc Company Institutional Animal Care Guidelinesに承認された実験手順書に従い行われた。試験に用いたメスのnu/nuマウスはCharles River Laboratories より購入し、MKN-45細胞、H1975細胞およびH1373細胞（各 5×10^6 細胞）をマウス背部皮下に移植した。平均腫瘍体積が $200\text{--}300\text{mm}^3$ になった後、腫瘍サイズおよび体重を用いてマウスをランダム化し、治療群毎の群分けを行った。試験毎に薬物を以下のように投与した。

（図11）c-Met 阻害剤であるPHA-665752は 25mg/kg/day の投与濃度で5日連続、コントロール群（溶媒のみ： 50mM L-lactate（ $\text{pH}4.8$ ）/ 10% polyethylene glycol）も同様の間隔で投与した。抗体およびADC群は以下の濃度で単回投与を行った。P3D12抗体（ 10mg/kg ）、P3D12-vc-MMAF（3、5、 10mg/kg ）、Rituximab -vc-MMAF（ 10mg/kg ）。

（図18）ヒト化抗c-Met抗体hD12-（cKf、fKf、cKa）-vc-PBDを0.25および 1.0mg/kg 、対照群のDenosumab-vc-PBDを 1.0mg/kg 、PBSを他投与群と同容量で1回静脈内投与した。

（図20、21）hD12-SG3227、hD12-SG3249 およびhD12-SG3259を0.125および 0.5mg/kg で1回静脈内投与した。対照群は他投与群と同容量のPBSを1回静脈内投与した。

（図24）部位特異的にリンカー-薬剤を融合させたhD12-SG3249（V282C、T289C、V422C）を0.125および 0.5mg/kg で1回静脈内投与した。対照群（stochastic conjugation）も同様に行った。

試験期間中、腫瘍体積および体重の測定を1週間あたり2回および3回行った。腫瘍体積は以下の計算式により算出した。 $V(\text{mm}^3) = \{0.5236 \times \text{long axis}$

length(mm) x (short axis length(mm))²。腫瘍体積±標準誤差はPrism 7 Software (GraphPad、LaJolla、CA) を用いて算出した。統計的有意性はPrism 7 Softwareを用いてtwo-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc testにより決定した。

抗体親和性測定

抗体の親和性はProteOn XPR36 (BIO-RAD) を用いて表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance : SPR) 法により測定した。試験に用いた緩衝液の組成は以下の通り (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20)。それぞれのサンプルを測定後、使用したセンサーチップは3 M MgCl₂ and 10 mM glycine pH1.5を用いて再生させた。結合応答性はブランクフローセルからレスポンスユニット (RU) を差し引くことによって算出した。

Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) アッセイ

MKN-45細胞を使用したADCC活性は、ADCC Reporter Bioassay Kit (Promega) を使用して分析した。MKN-45細胞は、マウスIgG₁アイソタイプ (R&D)、P3D12抗体、Rituximabの各濃度 (0~40μg / mL) でレポーターエフェクター細胞 (エフェクター：ターゲット比 2 : 1) と反応させた。ADCC アッセイは、製造元の説明に従って測定した。データはPrism 7ソフトウェア (GraphPad、La Jolla、CA) を使用して分析および曲線のフィッティングを行った。

キメラ抗体の作製

抗 c-Met マウスモノクローナル抗体 P3D12 の可変領域をヒト IgG₁ もしくは

IgG₂ の定常領域と、かつ L 鎖が kappa 鎖の組み合わせになるようにキメラ化した (図 3)。VH 鎖および Vk 鎖の DNA 配列を pFUSE2 CLIg-hk および pFUSE CHIg-hG1/2 (InvivoGen) に導入し、抗体は Expi293F (Thermo Fisher Scientific) を宿主として発現させた。

抗体の CDR グラフティング

抗 c-Met マウスモノクローナル抗体 P3D12 のヒト化は Padlan らの方法[20]を元に CDR のアミノ酸残基をヒト生殖細胞由来 IgG 配列に移し変えることにより行った。ヒト化配列は以下に名付けられた 4 配列を準備した。4 つのそれぞれの名前は”veneering[62]”, ”grafting of abbreviated CDRs[63]”, “grafting the whole CDRs onto a composite framework[64]”, ”CDR-grafting[65]”である。それぞれの配列はその特徴を表す文字を取り v, a, f, c とした。ヒト化したモノクローナル抗体は 4 つの独立した重鎖配列および 4 つの独立した kappa 軽鎖配列の組み合わせより作製した。ヒト化した P3D12 抗体は hD12 抗体と命名し、配列の組み合わせごとに区別した。例として、v 重鎖と a 軽鎖からなる hD12 は hD12-vKa と記す。

免疫抗体蛍光法

抗体の内在化を顕微鏡観察下で評価するため、EBC-1 細胞に 20μg/mL の hD12 を添加し、4℃もしくは 37℃で 30 分放置した後、PBS で洗浄、4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、20μg/mL の抗ヒト IgG- Alexa Fluor488 抗体を添加し、30 分間室温に放置した。EVOS FL Auto Cell Imaging System software (Thermo Fisher Scientific) を用いて画像を取得し、Z-stacking 法により画像を再構成した。

hD12 抗体とリンカー-薬物 (SG3249) の結合

hD12 抗体に、IgG の重鎖 Fc 領域に対にならないように、システイン残基を導入した。本抗体は、チャイニーズハムスター卵巢細胞株 (Chinese Hamster Ovary : CHO) を宿主とした安定発現細胞株から産生され、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーとそれに続く size-exclusion chromatography (SEC) を使用して精製した。抗体とリンカー-薬物の結合の前に、495 モル当量の L-グルタチオン (Sigma-Aldrich, #G6529, St. Louis, MO, USA) を使用して hD12 抗体を部分的に還元し、室温で 1 時間放置した後、グルタチオンをタンジェンシャルフローろ過(tangential flow filtration: TFF)により除去した。抗体とリンカー-薬物の結合のために、10 モル当量の 10 mM SG3249 DMSO 溶液を還元した抗体に添加し、室温で 1 時間放置した。15 倍過剰の N-アセチルシステイン(NAC: Acros Organics、 #160280250、The Hague、Netherlands) を添加することで反応を停止し、室温でさらに 15 分間放置した。NAC でキャップされた未反応の SG3249 は TFF を使用して緩衝液 (25mM ヒスチジン、85 g/L トレハロース二水和物、pH 5.5) 緩衝液に交換しながら除去した。ADC となった本抗体は 0.2 μ M のポリエーテルスルホン (PES) フィルターを使用して滅菌ろ過し、ポリソルベート-80 (Amresco、 # M126、Solon、OH、U.S.A.) を最終濃度 0.02% v/v になるまで添加し回収した。

ラット認容性試験

Sprague-Dawleyラットは体重によりランダム化し、群分けを行った。試験試薬はラットの尾静脈より投与した。投与後、ラットの体重を毎日測定した。血液を試験試薬投与前、投与後7日、14日、21日にそれぞれ採取した。

引用文献

- [1] D. Lee, E.S. Sung, J.H. Ahn, S. An, J. Huh, W.K. You, Development of antibody-based c-Met inhibitors for targeted cancer therapy, *Immunotargets Ther*, 4 (2015) 35-44.
- [2] E. Gherardi, W. Birchmeier, C. Birchmeier, G. Vande Woude, Targeting MET in cancer: rationale and progress, *Nat Rev Cancer*, 12 (2012) 89-103.
- [3] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 61 (2011) 69-90.
- [4] S. Yu, Y. Yu, N. Zhao, J. Cui, W. Li, T. Liu, C-Met as a prognostic marker in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis, *PLoS One*, 8 (2013) e79137.
- [5] X. Liu, W. Yao, R.C. Newton, P.A. Scherle, Targeting the c-MET signaling pathway for cancer therapy, *Expert Opin Investig Drugs*, 17 (2008) 997-1011.
- [6] E. Felip, L. Horn, J.D. Patel, H. Sakai, J. Scheele, R. Bruns, P.K. Paik, o.b.o.t.V.S. Group, Tepotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring MET exon 14-skipping mutations: Phase II trial, *Journal of Clinical Oncology*, 36 (2018) 9016-9016.
- [7] T. Kosaka, Y. Yatabe, H. Endoh, K. Yoshida, T. Hida, M. Tsuboi, H. Tada, H. Kuwano, T. Mitsudomi, Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib, *Clin Cancer Res*, 12 (2006) 5764-5769.
- [8] J.A. Engelman, J. Settleman, Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy, *Curr Opin Genet Dev*, 18 (2008) 73-79.
- [9] H. Jin, R. Yang, Z. Zheng, M. Romero, J. Ross, H. Bou-Reslan, R.A.

Carano, I. Kasman, E. Mai, J. Young, J. Zha, Z. Zhang, S. Ross, R. Schwall, G. Colbern, M. Merchant, MetMAb, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival, *Cancer Res*, 68 (2008) 4360-4368.

[10] Y.M. Oh, Y.J. Song, S.B. Lee, Y. Jeong, B. Kim, G.W. Kim, K.E. Kim, J.M. Lee, M.Y. Cho, J. Choi, D.H. Nam, P.H. Song, K.H. Cheong, K.A. Kim, A new anti-c-Met antibody selected by a mechanism-based dual-screening method: therapeutic potential in cancer, *Mol Cells*, 34 (2012) 523-529.

[11] C. Rolfo, N. Van Der Steen, P. Pauwels, F. Cappuzzo, Onartuzumab in lung cancer: the fall of Icarus?, *Expert review of anticancer therapy*, 15 (2015) 487-489.

[12] S.A. Greenall, E. Gherardi, Z. Liu, J.F. Donoghue, A.A. Vitali, Q. Li, R. Murphy, L. Iamele, A.M. Scott, T.G. Johns, Non-agonistic bivalent antibodies that promote c-MET degradation and inhibit tumor growth and others specific for tumor related c-MET, *PLoS One*, 7 (2012) e34658.

[13] M. Prat, T. Crepaldi, S. Pennacchietti, F. Bussolino, P.M. Comoglio, Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF, *Journal of cell science*, 111 (Pt 2) (1998) 237-247.

[14] M. Kong-Beltran, S. Seshagiri, J. Zha, W. Zhu, K. Bhawe, N. Mendoza, T. Holcomb, K. Pujara, J. Stinson, L. Fu, C. Severin, L. Rangell, R. Schwall, L. Amler, D. Wickramasinghe, R. Yauch, Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer, *Cancer Res*, 66 (2006) 283-289.

[15] J.R. McCombs, S.C. Owen, Antibody drug conjugates: design and

- selection of linker, payload and conjugation chemistry, *AAPS J*, 17 (2015) 339-351.
- [16] G.M. Dubowchik, R.A. Firestone, Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 1. A model study of structural requirements for efficient release of doxorubicin, *Bioorg Med Chem Lett*, 8 (1998) 3341-3346.
- [17] R.V. Chari, M.L. Miller, W.C. Widdison, Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy, *Angew Chem Int Ed Engl*, 53 (2014) 3796-3827.
- [18] K. Ohashi, P.L. Marion, H. Nakai, L. Meuse, J.M. Cullen, B.B. Bordier, R. Schwall, H.B. Greenberg, J.S. Glenn, M.A. Kay, Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses, *Nature medicine*, 6 (2000) 327-331.
- [19] K.H. Roux, L. Strelets, T.E. Michaelsen, Flexibility of human IgG subclasses, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159 (1997) 3372-3382.
- [20] M. Nishida, K. Teshigawara, O. Niwa, S. Usuda, T. Nakamura, P. Ralph, R. Newman, E.A. Padlan, Novel humanized anti-CD20 monoclonal antibodies with unique germline VH and VL gene recruitment and potent effector functions, *International journal of oncology*, 32 (2008) 1263-1274.
- [21] M. Kai, K. Motoki, H. Yoshida, C. Emuta, Y. Chisaka, K. Tsuruhata, C. Endo, M. Muto, M. Shimabe, U. Nishiyama, T. Hagiwara, A. Matsumoto, H. Miyazaki, S. Kataoka, Switching constant domains enhances agonist activities of antibodies to a thrombopoietin receptor, *Nat Biotechnol*, 26 (2008) 209-211.

- [22] P. Strop, K. Delaria, D. Foletti, J.M. Witt, A. Hasa-Moreno, K. Poulsen, M.G. Casas, M. Dorywalska, S. Farias, A. Pios, V. Lui, R. Dushin, D. Zhou, T. Navaratnam, T.T. Tran, J. Sutton, K.C. Lindquist, B. Han, S.H. Liu, D.L. Shelton, J. Pons, A. Rajpal, Site-specific conjugation improves therapeutic index of antibody drug conjugates with high drug loading, *Nat Biotechnol*, 33 (2015) 694-696.
- [23] P. Strop, S.H. Liu, M. Dorywalska, K. Delaria, R.G. Dushin, T.T. Tran, W.H. Ho, S. Farias, M.G. Casas, Y. Abdiche, D. Zhou, R. Chandrasekaran, C. Samain, C. Loo, A. Rossi, M. Rickert, S. Krimm, T. Wong, S.M. Chin, J. Yu, J. Dilley, J. Chaparro-Riggers, G.F. Filzen, C.J. O'Donnell, F. Wang, J.S. Myers, J. Pons, D.L. Shelton, A. Rajpal, Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates, *Chemistry & biology*, 20 (2013) 161-167.
- [24] <ACS Global Cancer Facts and Figures 2015.pdf>.
- [25] J. Bean, C. Brennan, J.Y. Shih, G. Riely, A. Viale, L. Wang, D. Chitale, N. Motoi, J. Szoke, S. Broderick, M. Balak, W.C. Chang, C.J. Yu, A. Gazdar, H. Pass, V. Rusch, W. Gerald, S.F. Huang, P.C. Yang, V. Miller, M. Ladanyi, C.H. Yang, W. Pao, MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (2007) 20932-20937.
- [26] Y.W. Zhang, Y. Su, O.V. Volpert, G.F. Vande Woude, Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 12718-12723.

- [27] D.R. Spigel, T.J. Ervin, R.A. Ramlau, D.B. Daniel, J.H. Goldschmidt, Jr., G.R. Blumenschein, Jr., M.J. Krzakowski, G. Robinet, B. Godbert, F. Barlesi, R. Govindan, T. Patel, S.V. Orlov, M.S. Wertheim, W. Yu, J. Zha, R.L. Yauch, P.H. Patel, S.C. Phan, A.C. Peterson, Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol*, 31 (2013) 4105-4114.
- [28] D.L. Lath, C.H. Buckle, H.R. Evans, M. Fisher, J.M. Down, M.A. Lawson, A.D. Chantry, ARQ-197, a small-molecule inhibitor of c-Met, reduces tumour burden and prevents myeloma-induced bone disease in vivo, *PLoS One*, 13 (2018) e0199517.
- [29] J. Wang, L. Goetsch, L. Tucker, Q. Zhang, A. Gonzalez, K.S. Vaidya, A. Oleksijew, E. Boghaert, M. Song, I. Sokolova, E. Pestova, M. Anderson, W.N. Pappano, P. Ansell, A. Bhathena, L. Naumovski, N. Corvaia, E.B. Reilly, Anti-c-Met monoclonal antibody ABT-700 breaks oncogene addiction in tumors with MET amplification, *BMC Cancer*, 16 (2016) 105.
- [30] M. Charakidis, M. Boyer, Targeting MET and EGFR in NSCLC-what can we learn from the recently reported phase III trial of onartuzumab in combination with erlotinib in advanced non-small cell lung cancer?, *Transl Lung Cancer Res*, 3 (2014) 395-396.
- [31] L. Rimassa, E. Assenat, M. Peck-Radosavljevic, M. Pracht, V. Zagonel, P. Mathurin, E. Rota Caremoli, C. Porta, B. Daniele, L. Bolondi, V. Mazzaferro, W. Harris, N. Damjanov, D. Pastorelli, M. Reig, J. Knox, F. Negri, J. Trojan, C. López López, N. Personeni, T. Decaens, M. Dupuy, W. Sieghart, G. Abbadessa, B. Schwartz, M. Lamar, T. Goldberg, D. Shuster, A. Santoro, J.

Bruix, Tivantinib for second-line treatment of MET-high, advanced hepatocellular carcinoma (METIV-HCC): a final analysis of a phase 3, randomised, placebo-controlled study, *The Lancet. Oncology*, 19 (2018) 682-693.

[32] P.K. Paik, E. Felip, R. Veillon, H. Sakai, A.B. Cortot, M.C. Garassino, J. Mazieres, S. Viteri, H. Senellart, J. Van Meerbeeck, J. Raskin, N. Reinmuth, P. Conte, D. Kowalski, B.C. Cho, J.D. Patel, L. Horn, F. Griesinger, J.Y. Han, Y.C. Kim, G.C. Chang, C.L. Tsai, J.C. Yang, Y.M. Chen, E.F. Smit, A.J. van der Wekken, T. Kato, D. Juraeva, C. Stroh, R. Bruns, J. Straub, A. Johne, J. Scheele, J.V. Heymach, X. Le, Tepotinib in Non-Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations, *N Engl J Med*, 383 (2020) 931-943.

[33] A. Hultberg, V. Morello, L. Huyghe, N. De Jonge, C. Blanchetot, V. Hanssens, G. De Boeck, K. Silence, E. Festjens, R. Heukers, B. Roux, F. Lamballe, C. Ginestier, E. Charafe-Jauffret, F. Maina, P. Brouckaert, M. Saunders, A. Thibault, T. Dreier, H. de Haard, P. Michieli, Depleting MET-Expressing Tumor Cells by ADCC Provides a Therapeutic Advantage over Inhibiting HGF/MET Signaling, *Cancer Res*, 75 (2015) 3373-3383.

[34] M. Merchant, X. Ma, H.R. Maun, Z. Zheng, J. Peng, M. Romero, A. Huang, N.Y. Yang, M. Nishimura, J. Greve, L. Santell, Y.W. Zhang, Y. Su, D.W. Kaufman, K.L. Billeci, E. Mai, B. Moffat, A. Lim, E.T. Duenas, H.S. Phillips, H. Xiang, J.C. Young, G.F. Vande Woude, M.S. Dennis, D.E. Reilly, R.H. Schwall, M.A. Starovasnik, R.A. Lazarus, D.G. Yansura, Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent, *Proc Natl Acad Sci U S A*,

110 (2013) E2987-2996.

[35] S. Agarwal, C. Zerillo, J. Kolmakova, J.G. Christensen, L.N. Harris, D.L. Rimm, M.P. Digiovanna, D.F. Stern, Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells, *Br J Cancer*, 100 (2009) 941-949.

[36] M. Jo, D.B. Stolz, J.E. Espen, K. Dorko, G.K. Michalopoulos, S.C. Strom, Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells, *J Biol Chem*, 275 (2000) 8806-8811.

[37] N. Godin-Heymann, L. Ulkus, B.W. Brannigan, U. McDermott, J. Lamb, S. Maheswaran, J. Settleman, D.A. Haber, The T790M "gatekeeper" mutation in EGFR mediates resistance to low concentrations of an irreversible EGFR inhibitor, *Mol Cancer Ther*, 7 (2008) 874-879.

[38] Z. Yu, T.J. Boggon, S. Kobayashi, C. Jin, P.C. Ma, A. Dowlati, J.A. Kern, D.G. Tenen, B. Halmos, Resistance to an irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor in EGFR-mutant lung cancer reveals novel treatment strategies, *Cancer Res*, 67 (2007) 10417-10427.

[39] S. Kobayashi, H. Ji, Y. Yuza, M. Meyerson, K.K. Wong, D.G. Tenen, B. Halmos, An alternative inhibitor overcomes resistance caused by a mutation of the epidermal growth factor receptor, *Cancer Res*, 65 (2005) 7096-7101.

[40] Z. Tang, R. Du, S. Jiang, C. Wu, D.S. Barkauskas, J. Richey, J. Molter, M. Lam, C. Flask, S. Gerson, A. Dowlati, L. Liu, Z. Lee, B. Halmos, Y. Wang, J.A. Kern, P.C. Ma, Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer, *Br J Cancer*, 99 (2008) 911-922.

- [41] M. Maemondo, A. Inoue, K. Kobayashi, S. Sugawara, S. Oizumi, H. Isobe, A. Gemma, M. Harada, H. Yoshizawa, I. Kinoshita, Y. Fujita, S. Okinaga, H. Hirano, K. Yoshimori, T. Harada, T. Ogura, M. Ando, H. Miyazawa, T. Tanaka, Y. Saijo, K. Hagiwara, S. Morita, T. Nukiwa, Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR, *N Engl J Med*, 362 (2010) 2380-2388.
- [42] F.A. Shepherd, J. Rodrigues Pereira, T. Ciuleanu, E.H. Tan, V. Hirsh, S. Thongprasert, D. Campos, S. Maoleekoonpiroj, M. Smylie, R. Martins, M. van Kooten, M. Dediu, B. Findlay, D. Tu, D. Johnston, A. Bezjak, G. Clark, P. Santabárbara, L. Seymour, Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer, *N Engl J Med*, 353 (2005) 123-132.
- [43] B.O. Van Emburgh, A. Sartore-Bianchi, F. Di Nicolantonio, S. Siena, A. Bardelli, Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer, *Mol Oncol*, 8 (2014) 1084-1094.
- [44] S.C. Sekhar, T. Kasai, A. Satoh, T. Shigehiro, A. Mizutani, H. Murakami, B.Y. El-Aarag, D.S. Salomon, A. Massaguer, R. de Llorens, M. Seno, Identification of caveolin-1 as a potential causative factor in the generation of trastuzumab resistance in breast cancer cells, *J Cancer*, 4 (2013) 391-401.
- [45] D.G. Maloney, A.J. Grillo-López, C.A. White, D. Bodkin, R.J. Schilder, J.A. Neidhart, N. Janakiraman, K.A. Foon, T.M. Liles, B.K. Dallaire, K. Wey, I. Royston, T. Davis, R. Levy, IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma, *Blood*, 90 (1997) 2188-2195.
- [46] W. Leimgruber, V. Stefanović, F. Schenker, A. Karr, J. Berger, Isolation

and characterization of anthramycin, a new antitumor antibiotic, *Journal of the American Chemical Society*, 87 (1965) 5791-5793.

[47] J. Wu, P.H. Clingen, V.J. Spanswick, M. Mellinas-Gomez, T. Meyer, I. Puzanov, D. Jodrell, D. Hochhauser, J.A. Hartley, gamma-H2AX foci formation as a pharmacodynamic marker of DNA damage produced by DNA cross-linking agents: results from 2 phase I clinical trials of SJG-136 (SG2000), *Clin Cancer Res*, 19 (2013) 721-730.

[48] M.S. Kung Sutherland, R.B. Walter, S.C. Jeffrey, P.J. Burke, C. Yu, H. Kostner, I. Stone, M.C. Ryan, D. Sussman, R.P. Lyon, W. Zeng, K.H. Harrington, K. Klussman, L. Westendorf, D. Meyer, I.D. Bernstein, P.D. Senter, D.R. Benjamin, J.G. Drachman, J.A. McEarchern, SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML, *Blood*, 122 (2013) 1455-1463.

[49] S.C. Jeffrey, P.J. Burke, R.P. Lyon, D.W. Meyer, D. Sussman, M. Anderson, J.H. Hunter, C.I. Leiske, J.B. Miyamoto, N.D. Nicholas, N.M. Okeley, R.J. Sanderson, I.J. Stone, W. Zeng, S.J. Gregson, L. Masterson, A.C. Tiberghien, P.W. Howard, D.E. Thurston, C.L. Law, P.D. Senter, A potent anti-CD70 antibody-drug conjugate combining a dimeric pyrrolobenzodiazepine drug with site-specific conjugation technology, *Bioconjug Chem*, 24 (2013) 1256-1263.

[50] L.R. Saunders, A.J. Bankovich, W.C. Anderson, M.A. Aujay, S. Bheddah, K. Black, R. Desai, P.A. Escarpe, J. Hampl, A. Laysang, D. Liu, J. Lopez-Molina, M. Milton, A. Park, M.A. Pysz, H. Shao, B. Slingerland, M. Torgov,

S.A. Williams, O. Foord, P. Howard, J. Jassem, A. Badzio, P. Czapiewski, D.H. Harpole, A. Dowlati, P.P. Massion, W.D. Travis, M.C. Pietanza, J.T. Poirier, C.M. Rudin, R.A. Stull, S.J. Dylla, A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo, *Sci Transl Med*, 7 (2015) 302ra136.

[51] S.C. Jeffrey, M.T. Nguyen, J.B. Andreyka, D.L. Meyer, S.O. Doronina, P.D. Senter, Dipeptide-based highly potent doxorubicin antibody conjugates, *Bioorg Med Chem Lett*, 16 (2006) 358-362.

[52] P.J. Burke, B.E. Toki, D.W. Meyer, J.B. Miyamoto, K.M. Kissler, M. Anderson, P.D. Senter, S.C. Jeffrey, Novel immunoconjugates comprised of streptonigrin and 17-amino-geldanamycin attached via a dipeptide-p-aminobenzyl-amine linker system, *Bioorg Med Chem Lett*, 19 (2009) 2650-2653.

[53] P.J. Burke, J.Z. Hamilton, S.C. Jeffrey, J.H. Hunter, S.O. Doronina, N.M. Okeley, J.B. Miyamoto, M.E. Anderson, I.J. Stone, M.L. Ulrich, J.K. Simmons, E.E. McKinney, P.D. Senter, R.P. Lyon, Optimization of a PEGylated Glucuronide-Monomethylauristatin E Linker for Antibody-Drug Conjugates, *Mol Cancer Ther*, 16 (2017) 116-123.

[54] R.Y. Zhao, S.D. Wilhelm, C. Audette, G. Jones, B.A. Leece, A.C. Lazar, V.S. Goldmacher, R. Singh, Y. Kovtun, W.C. Widdison, J.M. Lambert, R.V. Chari, Synthesis and evaluation of hydrophilic linkers for antibody-maytansinoid conjugates, *Journal of medicinal chemistry*, 54 (2011) 3606-3623.

[55] A.T. Lucas, L.S.L. Price, A.N. Schorzman, M. Storrie, J.A. Piscitelli, J.

- Razo, W.C. Zamboni, Factors Affecting the Pharmacology of Antibody-Drug Conjugates, *Antibodies* (Basel, Switzerland), 7 (2018).
- [56] T. Nakada, K. Sugihara, T. Jikoh, Y. Abe, T. Agatsuma, The Latest Research and Development into the Antibody-Drug Conjugate, [fam-] Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a), for HER2 Cancer Therapy, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 67 (2019) 173-185.
- [57] R.P. Lyon, T.D. Bovee, S.O. Doronina, P.J. Burke, J.H. Hunter, H.D. Neff-LaFord, M. Jonas, M.E. Anderson, J.R. Setter, P.D. Senter, Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index, *Nat Biotechnol*, 33 (2015) 733-735.
- [58] D. Schumacher, C.P. Hackenberger, H. Leonhardt, J. Helma, Current Status: Site-Specific Antibody Drug Conjugates, *J Clin Immunol*, 36 Suppl 1 (2016) 100-107.
- [59] K.J. Hamblett, P.D. Senter, D.F. Chace, M.M. Sun, J. Lenox, C.G. Cervený, K.M. Kissler, S.X. Bernhardt, A.K. Kopcha, R.F. Zabinski, D.L. Meyer, J.A. Francisco, Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate, *Clin Cancer Res*, 10 (2004) 7063-7070.
- [60] A. Lyons, D.J. King, R.J. Owens, G.T. Yarranton, A. Millican, N.R. Whittle, J.R. Adair, Site-specific attachment to recombinant antibodies via introduced surface cysteine residues, *Protein engineering*, 3 (1990) 703-708.
- [61] J.B. Stimmel, B.M. Merrill, L.F. Kuyper, C.P. Moxham, J.T. Hutchins, M.E. Fling, F.C. Kull, Jr., Site-specific conjugation on serine right-arrow cysteine variant monoclonal antibodies, *J Biol Chem*, 275 (2000) 30445-30450.

- [62] E.A. Padlan, A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties, *Molecular immunology*, 28 (1991) 489-498.
- [63] E.A. Padlan, C. Abergel, J.P. Tipper, Identification of specificity-determining residues in antibodies, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9 (1995) 133-139.
- [64] T.T. Wu, E.A. Kabat, Possible use of similar framework region amino acid sequences between human and mouse immunoglobulins for humanizing mouse antibodies, *Molecular immunology*, 29 (1992) 1141-1146.
- [65] P.T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, G. Winter, Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature*, 321 (1986) 522-525.

謝辞

本研究にあたり、始終懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました、福岡大学薬学部微生物薬品化学研究室 鹿志毛信広 教授に心から深謝致します。また、学位の取得に際し、審査ならびに御助言を賜りました福岡大学薬学部臨床薬物治療学研究室 大江賢治 教授、生化学研究室 本田伸一郎 教授、生体機能制御学研究室 佐野和憲 准教授に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大な御協力をいただきましたTANABE RESEARCH Laboratories U.S.A.,Inc 櫻井直樹 博士、Roland Newman 博士、Marco Gymnopoulos 博士、Julia Coronella 博士、Vincent Blot 博士に深く感謝致します。最後になりましたが始終温かい御助言、ご指導、サポートを戴きました田辺三菱製薬株式会社の皆様、TANABE RESEARCH Laboratories U.S.A.,Incの皆様心から感謝致します。

最後に、終始温かく支えてくれた家族をはじめ、数多くの方々に深く感謝いたします。